

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-050.824A

54. TITULO: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE
COMPRENDEN AL MENOS UN PRECURSOR SEXUAL EN
COMBINACIÓN CON AL MENOS UN MODULADOR
RECEPTOR DE ESTRÓGENO SELECTIVO

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 31/5685

71. SOLICITANTE: ENDORECHERCHE, INC.

DOMICILIO: QUEBEC, CANADÁ

74. APODERADO DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.



No. 07-050824-A-00000-0000

Fecha: 2012-08-23 09:56:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 314



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-050824-A-00000-0000

Fecha: 2007-05-22 16:11:15 Dep. 2020 NUECREACIONES
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 314

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

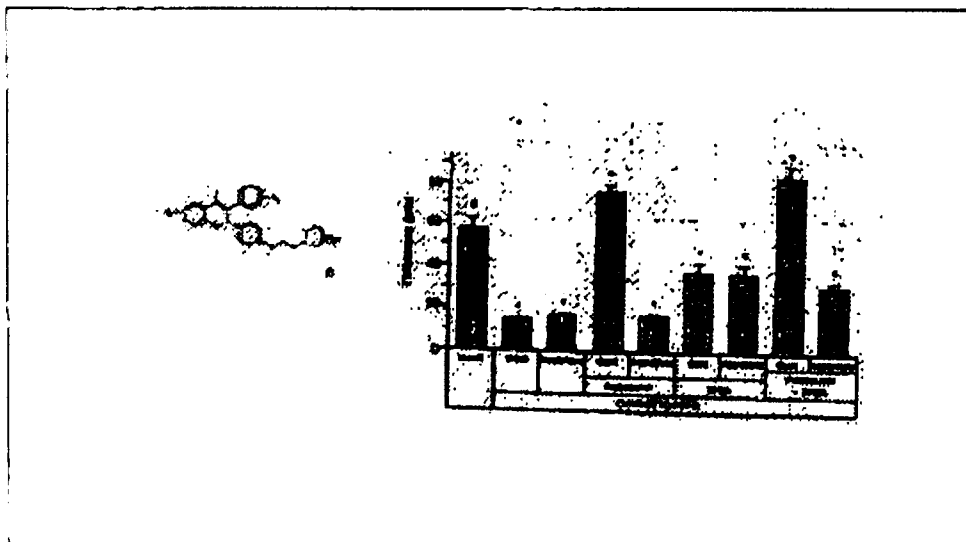
1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: ENDORECHERCHE, INC. Dirección: 2989, de la Promenade, Sainte-Foy, Quebec G1W 215, Canadá Nacionalidad o domicilio: Quebec, Canadá Lugar de constitución: Canadá		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☒ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 8181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. EL-ALFY, Mohamed; 2. LABRIE, Fernand; 3. BERGER, Louise Dirección: 1. 3414 Maricourt, Apt. 1, Sainte-Foy, Quebec G1W 2M5, Canadá; 2. 2989, de la Promenade, Sainte-Foy, Quebec G1W 215, Canadá; 3. 3385 Maricourt #19, Sainte-Foy, Quebec G1W 2M2, Canadá Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Canadienses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/CA2005/001612 Fecha: Oct. 20, 2005 Publicación Internacional No. WO2006/042409 A1 Fecha: Abril 27, 2006			
6) Título (54) <u>PRECURSORES ESTEROIDES SEXUALES SOLOS O EN COMBINACIÓN CON UN MODULADOR RECEPTOR DE ESTRÓGENO SELECTIV Y/O CON ESTRÓGENOS Y/O CON UN INHIBIDOR DE FOSFODIESTERASA GMPC DE TIPO 5 PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE SEQUEDAD VAGINAL Y DISFUNCIÓN SEXUAL EN MUJERES POST-MENOPÁUSICAS.</u>			
7) Clasificación Internacional: A61K 31/5685 A61K 31/566 A61K 31/453 A61K 31/519 A61P 15/02			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	Estados Unidos	Oct. 20, 2004	60/620,452
9) C mprobante de pago N°.			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página			

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujo).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujo)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA y traducción anexos
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arta final 12 x 12 y 8 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otras:
 1. Reporte internacional de búsqueda
 2. Opinión escrita
 3. Carta Agosto 18, 2006
 4. Carta Enero 2, 2007

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

[Handwritten signature]
C.C. 41.654.882 de Bogotá (TP 20824 CSJ)

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página



No. 07-050824-A-00000-0000

Fecha: 2012-08-23 09:56:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 314

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

ENDORECHERCHE, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
CANADÁ	2989 de la Promenade, Sainte-Foy, Quebec G1W 215	QUEBEC
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA

Apellidos y Nombre

C.C. 41.654.882

Documento de identificación

20824 CSJ

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clarkemodet@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

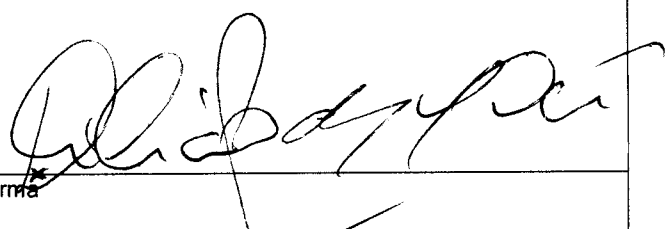
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

000063

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente <u>07-050.824A</u> De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. _____	Fecha _____
----------------------------------	-------------

6. Anexos	☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético
-----------	---

7. Firma	
DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Nombre y apellidos	 Firma
C.C. 41.654.882	Tarjeta Profesional 20824 CSJ

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN AL
MENOS UN PRECURSOR SEXUAL EN COMBINACION CON AL
MENOS UN MODULADOR RECEPTOR DE ESTRÓGENO
SELECTIVO.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina que utiliza precursores sexuales esteroides sólo o en una
10 terapia de combinación novedosa en animales de sangre caliente susceptibles, incluso humanos. En particular, la combinación incluye administrar un modulador receptor de estrógeno selectivo (SERM) y elevando el nivel del
15 paciente de precursores esteroides sexuales, dicho precursor seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-diol). También pueden administrarse estrógenos
20 para contrarrestar los efectos potenciales de algunos SERMs en bochornos y otros síntomas menopáusicos. También puede administrarse un inhibidor de fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 para mejorar la actividad sexual. La

invención también se refiere a equipos y composiciones farmacéuticas para practicar la combinación anterior.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

En la patente EUA 5,843, 932, se informó el efecto en atrofia vaginal de uno, tres o seis meses de tratamiento con DHEA administrada dos veces diariamente a una dosis de 30 mg en una solución de 50% etanol-50% propilenglicol en una área de 2 cm² de la piel dorsal en una rata ovariectomizada. El examen histopatológico mostró la proliferación y purificación del epitelio vaginal e inversión de atrofia mucosal vaginal en ratas tratadas con DHEA.

15

El estudio realizado con ratas, cuando se aplicó DHEA en la piel dorsal para 1, 3 y 6 meses examinó sólo el efecto en el epitelio vaginal (Souria et al., 1998, J. Steroid Biochem MoI Biol., 66(3): 137-149) y no en las otras dos capas, a saber la propia lámina y capa muscularis. Entonces se observó que DHEA era aproximadamente 10 veces más eficaz en el epitelio vaginal cuando se aplicaba tópicamente, que cuando se administraba en la piel a un sitio distante de la vagina, exigiendo así la absorción sistémica para ejercer su acción.

000065

En un estudio anterior sobre el efecto de la DHEA administrada en la piel en las mujeres post-menopáusicas durante 12 meses, en una crema de DHEA al 10%, sólo fue evaluada la actividad estrogénica de DHEA (Labrie et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 3498-3505). Se indicó (página 3500) "Vaginal cytology was examined as specific parameter of the estrogénico action of DHEA" ("Se examinó citología vaginal como parámetro específico de la acción estrogénica de DHA"). Esto es debido al método de evaluación, a saber, frotis vaginal que se limita a las células superficiales y fácilmente eliminadas del epitelio.

La presente invención describe los efectos de la DHEA y otros componentes en las tres capas de la vagina, a saber la capa *muscularis*, lámina propia y el epitelio con los beneficios novedosos a los tres niveles. Se cree que los efectos beneficiosos de la DHEA la lámina propia y *muscularis* son de importancia mayor para la acción positiva de inhibidores de fosfodiesterasa de GMPC de tipo 5, como el viagra y otros compuestos o prostaglandina E1.

La sequedad vaginal afecta al 50% de las mujeres en el periodo post-menopáusico aproximadamente a la edad de 50 a 60 años y 72% después de 70 años (Rossin-Amar, 2000, Gynecol Obstet Fertil, 28(3): 245-249). Aproximadamente de estas mujeres, el 80% experimenta

000066

trastornos urogenitales, sobre todo vaginitis y
dispareunia (Pandit and Ouslander, 1997, Am J Med Sci,
314(4): 228 - 31). Desde que se cree que estos problemas
son referidos por lo menos parcialmente a una privación de
5 esteroides sexuales, la terapia de reemplazo hormonal
local apropiada debe ser considerada en la etapa de la
menopausia. Se ha reconocido recientemente que no sólo se
privan las mujeres post-menopáusicas de estrógenos
ováricos sino también se privan progresivamente de los
10 andrógenos que originan la transformación intracrina
periférica de dehidroepiandrosterona (DHEA) tanto en
andrógenos como estrógenos (Labrie et al., 1991, Mol Cell
Endocrinol, '78: C113-C118; Labrie et al., 1995, Ann NY
Acad Sci, 774: 16-28; Labrie et al., 2003, End Rev, 24(2):
15 152-182). De hecho, el suero de DHEA y DHEA - S
progresivamente disminuyen de la edad de 30 a 40 años
(Labrie et al., 2003, End Rev, 24(2): 152-182; Orentreich
et al., 1984, J Clin Endocrinol Metab, 59: 551-555; Labrie
et al., 1997, J Clin Endocrinol Metab, 82: 2396-2402). Una
20 serie de estudios indica que los niveles bajos de DHEA y
DHEA-S están asociados con una serie de morbilidad y
enfermedades relacionadas con la edad (Labrie et al.,
1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 3498-3505;
Helzlsouer et al., 1992, Cancer Res, 52(1): 1-4; Szathmar
25 et al., 1994, Osteoporos Int, 4(2): 84-88; Thoman and

000067

Weigle, 1989, Adv Immununol, 46: 221-261; Barrett-Connor et al., 1999, J Reprod Med, 44(12): 1012-1020; Barrett-Connor et al., 1999, J Am Geriatr Soc, 47(6): 685-691).

Un enfoque eficaz para aliviar la sequedad vaginal y otros síntomas menopáusicos son el uso de terapia de reemplazo de hormonas (HRT) (Greendale y Judd, 1993, J Es Geriatr Soc, 41(4): 426-436; el Studd et al., 1980, Pasetto, Paleotti and Ambrus Eds, MT Press, Lancaster, p: 127-139). Sin embargo, recientes estudios clínicos han indicado que combinando los estrógenos y progestinas aumenta la incidencia de cáncer de mama con un impacto negativo potencial en los eventos cardiovasculares (Colditz et al., 1995, N Engl J Med, 332: 1589- 1593; Ross et al., 2000, J Natl Cancer Inst, 92(4): 328-332; Rossouw et al., 2002, JAMA, 288(3): 321-333). Hay un interés creciente entretanto, en el potencial de la terapia de reemplazo de estrógeno-andrógeno combinada (Rosenberg et al., 1997, J Reprod Med, 42(7): 394-404; Burd et al., 2001, Curr Women Health Rep, 1(3):202-205), aunque el uso del componente estrogénico está limitado por las complicaciones potenciales arriba mencionadas. Basado en los recientes adelantos en nuestra comprensión de la fisiología de esteroides sexuales humanos, - sobre todo en las mujeres post-menopáusicas (Labrie et al., 1991, MoI Cell Endocrinol, 78: C113-C118; Labrie et al., 2003, end

Rev, 24(2): 152-182), el uso de DHEA se vuelve una posibilidad de proporcionarles los niveles apropiados de andrógenos y estrógenos sintetizados a las mujeres postmenopáusicas en los tejidos específicos, por los
5 mecanismos intracrinales, sin los efectos sistémicos (Labrie et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 3498-3505: 16-28; Labrie et al., 2003, End Rev, 24(2): 152-182; Labrie, 2001, Ref Gyn Obstet, 8: 317-322; Lasco et al., 2002, 145: 457-461). La restauración de elementos
10 andrógeno-sensibles de la función vaginal, también deben ayudar la acción de inhibidores fosfodiesterasa GMPC de tipo 5 o prostaglandina E1.

El modulador receptor de estrógeno selectivo (SERM) Acolbifeno (EM-652) es originalmente un benzopirano
15 derivado desarrollado para la prevención y tratamiento de cáncer de mama (Gauthier et al., 1997, J Med Chem, 40: 2117-2122). Acolbifeno es el compuesto que tiene la afinidad más alta de todos los compuestos conocidos por ER (Gauthier et al, 1997, J Med Chem, 40: 2117-2122; Labrie
20 et al., 1999, J Steroid Biochem Mol Biol, 69 (1-6): 51-84; Tremblay et al., 1997, Mol. Endocrinol., 11: 353-365) y ejerce su actividad en ambos ER α and ER β (Tremblay et al., 1998, Endocrinology, 139: 111-118). Este compuesto despliega una actividad pura y altamente potente del
25 antiestrogénico en la glándula mamaria y endometrio

mientras reduce el colesterol de suero y triglicéridos y previniendo la pérdida de hueso, por lo menos en la rata (Labrie et al., 1999, Steroid Biochem Mol Biol, 69 (1-6): 51-84). Es más, se ha demostrado que la administración de DHEA, no sólo no interfiere, sino ejerce un efecto inhibitorio aditivo con el antiestrógeno Acolbifeno puro en el crecimiento de tumor de mama en humanos y en el ratón desnudo (Dauvois et al., 1991, Cancer Res, 51: 3131-3135; Luo et al., 1997, Endocrinology, 138: 4435- 4444).

El tratamiento combinado de DHEA y Acolbifeno se ha propuesto como un quimipreventivo beneficioso y enfoque terapéutico en el cáncer de mama (Labrie, 2001, Ref Gynecol Obstet, 8: 317-322). De hecho, el efecto inhibitorio de DHEA en el crecimiento de xenoinjertos en el cáncer de mama en humanos y en ratones desnudos, soporta su uso como terapia de reemplazo de hormonas (Dauvois et al., 1991, Cancer Res, 51: 3131-3135; Couillard et al., 1998, J Natl Cancer Inst, 90: 772-778).

WO 99/63974 describe los usos médicos de un receptor modulador de estrógeno selectivo en combinación con precursores esteroides sexuales.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proveer métodos eficaces de tratamiento para

000070

problemas vaginales, más particularmente para la sequedad vaginal, dispareunia, y disfunciones sexuales que pueden conducir a la disminución del deseo y actividad sexual mientras minimiza los efectos colaterales indeseables.

- 5 Otro objeto es proveer métodos para reducir el riesgo de adquirir los problemas anteriores.

En una modalidad, la invención pertenece a un método de tratamiento para reducir el riesgo de contraer sequedad vaginal que comprende niveles crecientes de un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que
10 consiste de dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-diol), en un sujeto o paciente en necesidad de dicho tratamiento o dicho precursor esteroide, y además
15 comprendiendo la administración a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador receptor de estrógeno selectivo (SERM) como parte de una terapia de combinación.

En otra modalidad, la invención incluye una
20 administración adicional de estrógenos para contrarrestar los efectos de SERMs de bochornos y otros síntomas menopáusicos.

En otra modalidad, la invención incluye la administración adicional de un inhibidor de fosfodiesterasa de GMPc de Tipo 5 de prostaglandina E1 para mejorar la actividad sexual.

5 Como se utiliza en la presente invención, un modulador receptor de estrógeno selectivo (SERM) es un compuesto que ya sea directamente o a través de sus funciones metabólicas activas como un antagonista receptor de estrógeno ("antiestrógeno") en el tejido de mama, de
10 hecho provee un efecto estrogénico o de estrógeno - en el tejido óseo y en los niveles de colesterol en suero (es decir, reduciendo el colesterol en suero). Es probable que funcionen como un SERM, los compuestos no eesteroidaleses que funcionan como antagonistas receptores de estrógeno en
15 el tejido de mama in vitro o en humanos, o de rata (sobre todo si el compuesto actúa como un antiestrógeno en células cancerígenas de mama en humanos). A la inversa, los antiestrógenos esteroidales tienden a no funcionar como SERMs porque tienden a no mostrar ningún efecto
20 benéfico en el colesterol en suero. Los antiestrógenos no-esteroidales que se han encontrado y probado para funcionar como SERMs incluye EM-800, EM-01538, Raloxifeno, Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, TSE-424, ERA-923, Lasoxifeno (CP 336156), Arzoxifeno (LY 353 381) y
25 GW-5638. Se han probado los antiestrógenos esteroidales

ICI 182,780 y se ha encontrado que no funcionan como
SERM. Los SERMs, de acuerdo con la invención, pueden ser
administrados con la misma dosificación que se conoce en
la técnica, cuando estos compuestos son utilizados como
5 antiestrógenos.

Sin tener la intención de limitarse a esta
teoría, se cree que en lo que respecta a los SERMs, muchos
de los cuales, preferentemente, tienen dos anillos
aromáticos unidos por uno o dos átomos de carbono, que se
10 espera que interactúen recíprocamente con el receptor de
estrógeno en virtud de la porción anterior de la molécula
que es la mejor reconocida por el receptor. Los SERMs
preferidos tienen cadenas que puede caEUAr selectivamente
propiedades antagónicas en el tejido de mama sin tener
15 propiedades antagónicas significativas en otros tejidos.
Por lo tanto, los SERMs pueden funcionar deseablemente
como antiestrógenos en mama, mientras funcionan
sorprendente y deseablemente como estrógenos (o proveyendo
una actividad similar al estrógeno) en hueso y en los
20 componentes hemáticos (donde las concentraciones de
lípidos y/o colesterol se ven favorablemente afectadas).
El efecto favorable en el colesterol y/o en lípidos se
traduce potencialmente en un efecto favorable contra
aterioesclerosis que se conoce por ser afectado

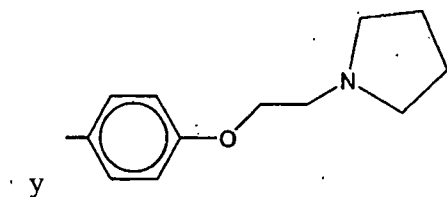
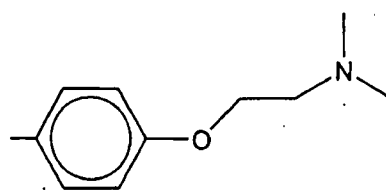
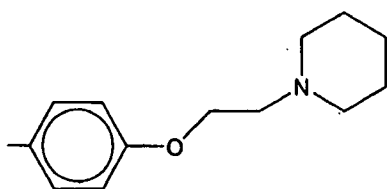
adversamente por los niveles inadecuados de colesterol y lípidos.

En otra modalidad, la invención incluye un método, una composición farmacéutica y un kit o equipo en
5 donde el modulador receptor estrógeno selectivo tiene una fórmula molecular con las siguientes características:

a) dos anillos aromáticos separados por 1 a 2 átomos de carbono que intervienen, ambos anillos aromáticos siendo tanto no sustituidos como sustituidos
10 por un grupo hidroxilo o un grupo convertido in vivo a hidroxilo;

b) una cadena lateral poseyendo un anillo aromático y una función amina terciaria o sal de la misma.

Se prefiere que la cadena lateral sea
15 seleccionada del grupo que consiste de:



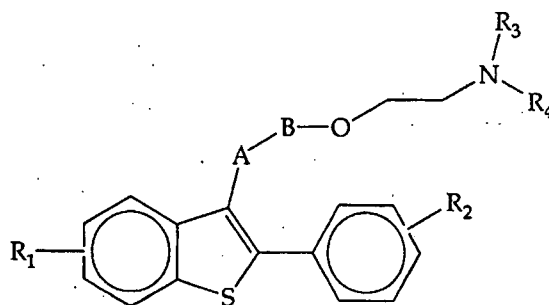
000074

También se prefiere que los dos anillos aromáticos sean fenilo y que la cadena lateral posea una porción seleccionada del grupo que consiste de metino, a metileno, -CO-, -O-, and -S-, un anillo aromático, y una
5 función amino terciaria o sal de la anterior.

En otra modalidad, el modulador receptor de estrógeno selectivo es seleccionado del grupo que consiste de un derivado de benzotiofeno, derivado de trifeniletileno, derivado de indol, derivado de
10 benzopirano, 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno y derivado de centcromano.

En una modalidad, se prefiere que el modulador receptor de estrógeno selectivo sea un derivado de benzotiofeno del compuesto de la siguiente fórmula:

15



en donde R1 y R2 son independientemente seleccionados del grupo que consiste de: hidrógeno, hidroxilo, y una porción convertida in vivo en hidroxilo; en donde R3 y R4 son tanto independientemente

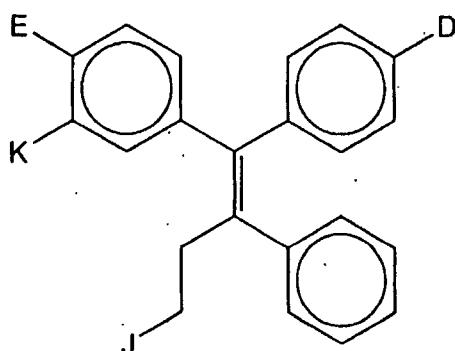
000075

seleccionados del grupo que consiste de: alquilo C1-C4, o en donde R3, R4 y nitrógeno al cual se unen, juntos son una estructura seleccionada del grupo que consiste de pirrolidino, dimetil-1-pirrolidino, metil-1-pirrolidinilo, 5 piperidino, hexametenimino y morfolino; en donde A es seleccionada del grupo que consiste de - CO -, - CHOH, y - CH2 -;

en donde B es seleccionada del grupo que consiste del fenileno, piridilideno, y - cicloC4H2N2.

10 Particularmente, el modulador receptor de estrógeno selectivo es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381) y LY 335563.

En otra modalidad, se prefiere que el modulador receptor de estrógeno selectivo sea un derivado 15 trifeniletileno del compuesto de la siguiente fórmula:

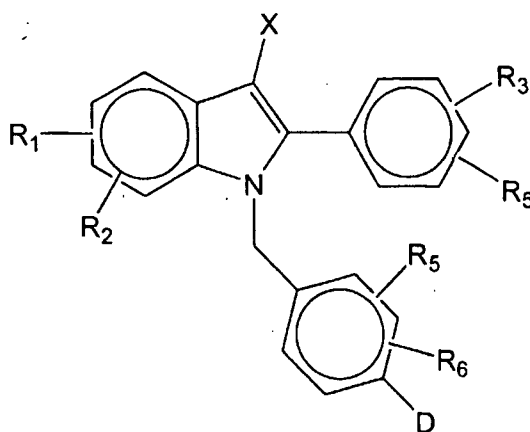


en donde del en el es de D - OCH2CH2N(R3)R4 o - CH=CH-COOH (R3 y R4 ya sea independientemente

seleccionados del grupo que consiste del alquilo C1-C4, ó
 R3, R4, y el átomo de nitrógeno al que se unen, juntos
 formando un anillo de estructura seleccionado del grupo
 que consiste de pirrolidino, dimetil-1-metilo-1-
 5 pirrolidinilo, piperidino, hexametilenimino y morfolino);
 donde E y K son independientemente hidrógeno o hidroxilo;
 donde J es hidrógeno o halógeno.

Particularmente, el modulador receptor de
 estrógeno selectivo es Tamoxifen, OH-tamoxifen,
 10 Droloxifeno, Toremifeno, Yodoxifeno, y GW 5638.

En otra modalidad, se prefiere que el modulador
 receptor de estrógeno selectivo sea un compuesto derivado
 de indol de la siguiente fórmula:



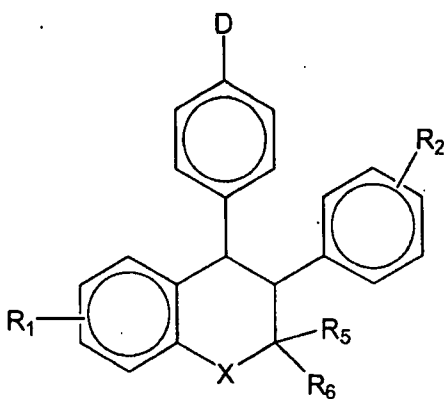
15 donde D es seleccionado del grupo que consiste de
 -OCH2CH2N(R7)R8, -CH=CH-CO N(R7)R8, -CC-(CH2)n-N(R7)R8 (R7
 y R8 cualquiera siendo independientemente seleccionado del

grupo que consiste de alquilo de C1-C6, o R7, R8 y el átomo de nitrógeno al cual están unidos, juntos formando una estructura de anillo seleccionada del grupo que consiste de anillo de pirrolidino, dimetil-1-pirrolidino, metil-1-pirrolidinilo, piperidino, hexametilenimino, morfolino); en donde X es seleccionado del grupo que consiste de: hidrógeno, y alquilo C1-C6;

en donde R1, R2, R3, R4, R5, y R6 son independientemente seleccionados del grupo que consiste de: hidrógeno, hidroxilo, alquilo de C1-C6, y una porción convertida in vivo en hidroxilo.

Particularmente, el modulador receptor de estrógeno selectivo es TSE-424 y ERA-923.

En otra modalidad, se prefiere que el modulador receptor de estrógeno selectivo se un compuesto de la siguiente fórmula:



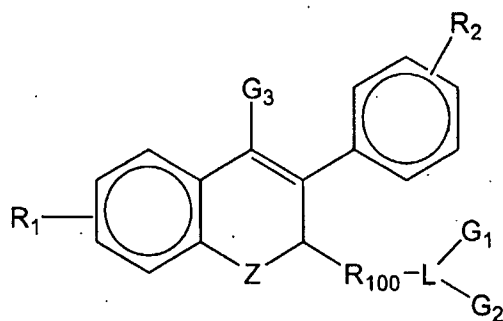
000078

en donde R1 y R2 son independientemente
 seleccionados del grupo que consiste de: hidrógeno,
 hidroxilo, y una porción convertida in vivo a hidroxilo;
 en donde R5 y R6 son independientemente hidrógeno o
 5 alquilo C1-C6; en donde D es -OCH2CH2N(R3)R4 (R3 and R4
 cualquiera siendo independientemente seleccionado del
 grupo que consiste de alquilo de C1-C4 , o R3, R4 y el
 átomo de nitrógeno al cual están unidos, juntos formando
 una estructura de anillo seleccionado del grupo que
 10 consiste de pirrolidino, dimetil-1-pirrolidino, metil-1-
 pirrolidinilo, piperidino, hexametilenimino, morfolino).

En donde X is seleccionado del grupo que consiste
 de -O- y -CH2-.

Particularmente, el compuesto es seleccionado del
 15 grupo que consiste de: (-)-cis-(5R,6S)-6-fenil-5-[4-(2-
 pirrolidin-1-il)etoxi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-
 2-ol, D-(-)-sal de tartrato (lasofoxifeno) y (3,4-trans-
 2,2-dimetil-3-fenil-4-[4-(2-(2-(pirrolidin-1-
 il)etoxi)fenil]-7-metoxi-cromano).

20 En otra modalidad, se prefiere que el modulador
 receptor de estrógeno selectivo tenga la siguiente
 fórmula:



donde R_1 and R_2 son independientemente hidrógeno, hidroxilo o una porción que se convierte a hidroxilo in vivo; en donde Z es una porción de cierre bivalente particularmente; Z es seleccionada del grupo que consiste de $-O-$, $-NH-$, $-S-$, y $-CH_2-$;

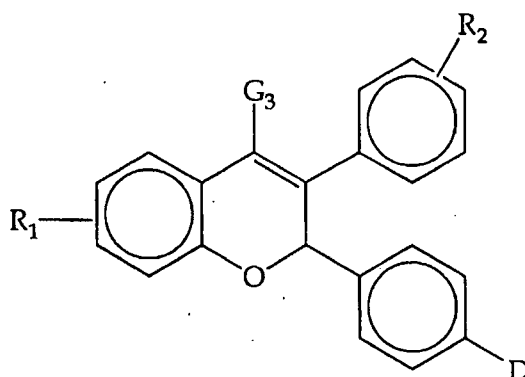
donde la R_{100} es una porción bivalente cuyas distancias L del anillo-B por cada 4-10 átomos que intervienen; en donde L es una porción polar bivalente o trivalente seleccionada del grupo de $-SO-$, $-CON-$, $-N<$, y $-SON<$;

donde G_1 es seleccionada del grupo que consiste de hidrógeno, a hidrocarburo C_1 a C_5 o una porción bivalente que se une a G_2 y L para formar un anillo heterocíclico de 5- a 7- miembros, u un derivado halo no saturado del anterior.

donde G_2 es cualquiera, ausente o seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, un hidrocarburo C_1 a C_5 o una porción bivalente que se une a G_1 y a L para

formar un anillo heterocíclico de 5 - a 7- miembros, y derivados halo o no saturados del anterior; en donde G3 es seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, metilo y etilo.

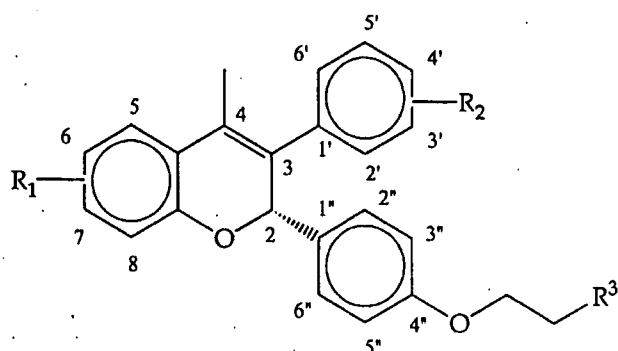
- 5 Más particularmente, se prefieren derivados de benzopirano de la siguiente estructura general:



- Donde D is $-OCH_2CH_2N(R_3)R_4$ (R_3 y R_4 cualquiera siendo independientemente seleccionado del grupo que consiste de alquilo C1-C4 , o R_3 , R_4 y el átomo de nitrógeno al cual están unidos, juntos formando una estructura de anillo seleccionada del grupo que consiste de anillo pirrolidino, dimetil-1-pirrolidino, metil-1-pirrolidinilo, piperidino, hexametilenimino, morfolino).

- 15 donde R_1 y R_2 son independientemente seleccionados del grupo que consiste de: hidrógeno, hidroxilo, y una porción convertida in vivo en hidroxilo.

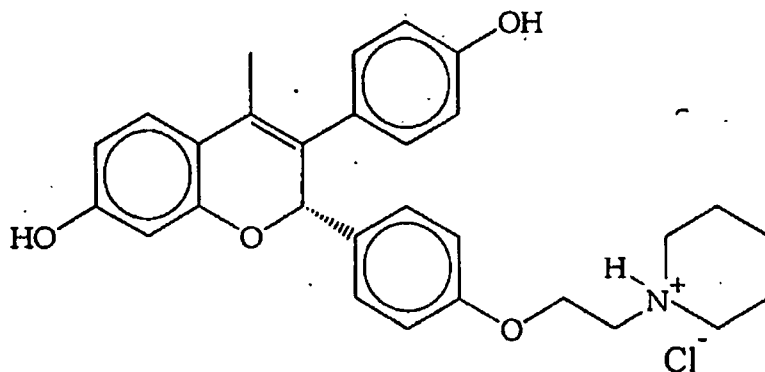
También se prefiere que los derivados de benzopirano sean compuestos óptimamente activos teniendo una absoluta configuración de S en el carbono 2 o sales farmacéuticamente aceptables de la anterior, dichos 5 compuestos tienen la siguiente estructura molecular:



donde R1 and R2 son independientemente seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo y una porción convertible in vivo a hidroxilo; en donde R3 es 10 una especie seleccionada del grupo que consiste de pirrolidinilo saturado, no saturado o sustituido, piperidino saturado, no saturado o sustituido, piperidinilo saturado, no saturado o sustituido, morfolino saturado, no saturado o sustituido, porción cíclica que 15 contiene nitrógeno, porción policíclica que contiene nitrógeno, y NRaRb (Ra y Rb siendo independientemente hidrógeno, alquilo C1-C6 recto o ramificado, alquenilo C2-C6 recto o ramificado, y alkinilo C2-C6 recto o ramificado).

En una modalidad, el derivado de benzopirano es una sal de un ácido seleccionado del grupo que consiste de ácido acético, ácido adípico, ácido bencensulfónico, ácido benzoico, ácido alcanforsulfónico, ácido cítrico, ácido
 5 fumárico, ácido hidroyódico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido hidroclorotiazídico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido maleico, ácido metansulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido 1,5-naftalendisulfónico, ácido nítrico, ácido palmítico, ácido
 10 piválico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido tereftálico, ácido p-toluensulfónico y el ácido valérico.

El modulador receptor de estrógeno selectivo preferido es:



15 Acolbifeno

Raloxifeno, Arzoxifeno, Tamoxifen, Droloxifeno, Toremifeno, Yodoxifeno, GW 5638, TSE-424, ERA-923, y lasofoxifeno.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la división a lo largo del eje longitudinal de la vagina de una rata en siete segmentos transversales, desde el orificio externo (ostium) (segmento 1) al nivel de cérvix (segmento 7) (portio vaginalis uteri).

La figura 2 muestra la histomorfología del epitelio vaginal del segmento 5 en los nueve grupos de ratas. Pulgadas barias (J), 40µm.

10 (A) Como representante del efecto estrogénico, el epitelio escamoso estratificado de ratas cycling y en periodo de celo consiste de cuatro capas principales: una capa celular de estratum basale (b), 6 a 7 capas celulares stratum spinosum (s) y una stratum granulosum de 5 a 6 15 capas (g) recubiertas por el stratum corneum (c) formadas por células cornificadas aplanadas y herméticamente empaquetadas.

(B) Las ratas en ciclo en el período interestral (PIE) proestrus que está bajo una estrogénica- 20 progestacional se utilizan para ilustrar la mucificación. En la mayoría de los segmentos 2 a 7, se recubrió una capa celular basal (b) por 5 a 6 capas celulares de stratum

spinosum (s), y una mucificación del estrato (m) consistiendo en 3-4 capas de células mucosas.

(C) En el control OVX, se recubrió una capa celular basal (b) por una capa de células cuboidales
5 atróficas (a).

(D) El epitelio vaginal de ratas OVX tratado con una dosis diaria oral de Acolbifeno, (2.5 mg/kg) muestra atrofia, pero con una capa exterior de células mucosas columnares bajas (m) recubriendo capa celular basal (b).

10 (E) El epitelio Vaginal de ratas OVX se trató con una dosis oral diaria de Premarin (0.5 mg/kg). La atrofia inducida por OVX se reemplazó por un modelo estrogénico comparable con lo encontrado en el periodo estrus.

(F) En animales OVX que recibieron Premarin +
15 Acolbifeno, la atrofia predominó con una morfología similar a la de los animales tratados con Acolbifeno, aunque se apreciaron células mucosas más grandes.

(G) Seguido del tratamiento de animales OVX con una aplicación diariamente cutánea de DHEA (80 mg/kg) en
20 una área de 2x2 centímetros de la piel dorsal, se vió un epitelio hipertrófico constituido por 3-5 capas de células mucosas (m) recubriendo una capa basal (b). Varias invaginaciones caracterizaron este epitelio (flecha).

(H) En la mayoría de las áreas del epitelio vaginal de los animales tratados con DHEA + Acolbifeno - una capa de células mucosas (m) se apoyó sobre una capa de células basales (b), mientras en algunas áreas, muchas 5 capas de células mucosas recubrieron la capa de células basales. Varias invaginaciones caracterizaron este epitelio (flechas).

(I) El tratamiento con DHEA + Premarin condujo a un epitelio mixto compuesto de tres a siete epitelio(s) 10 escamoso(s) estratificado(s) células de espesor de capa celular recubierto(s) por 3-5 capas de células mucosas (m) en 3 animales. En 2 animales, las áreas del epitelio escamoso estratificado eran predominantes (inserto). Barias en inserto 30µm.

15 (J) Cuando se combinaron DHEA, Premarin y Acolbifeno, el epitelio era similar al del grupo de DHEA + Acolbifeno.

La figura 3 muestra la mucosa vaginal de animales OVX mostrando, en (A), cambios inflamatorios 20 severos caracterizados por la infiltración focal de leucocitos con microabscesos intraepiteliales (M) y, en (B), la erosión focal (E) caracterizada por el espesor epitelial reducido y una ulceración (U) visualizada como una desaparición completa del epitelio.

La figura 4 ilustra el efecto similar al estrógeno del Acolbifeno en el segmento 1 de revestimiento del epitelio vaginal (abertura externa), se hacen comparaciones con los grupos pertinentes. En las ratas
5 intactas en el estrus (A) y en animales tratados con Premarin (D), el epitelio es un espesor de 10-15 capas y keratinizado. En los controles OVX (B), el espesor epitelial se reduce a 4-6 capas y generalmente no está keratinizado (ver la ausencia de stratum granulosum)
10 mientras que en los animales tratados con Acolbifeno (C), el espesor se restaura a 9-11 capas y es keratinizado.

La figura 5 muestra el espesor (μm) de los tres diferentes compartimentos vaginales al nivel del quinto segmento de la vagina de la rata: a) el epitelio, b)
15 lámina propia, c) *muscularis* y d) espesor total, después de un tratamiento de 36 semanas de animales OVX con DHEA, Premarin y Acolbifeno, solo o en combinación. Se agregan animales intactos al estrus y proestrus como controles de referencia. Los grupos compartiendo la misma letra no son
20 estadísticamente diferentes en $p < 0.05$.

La figura 6 muestra la reducción en tamaño o la compacidad de las fibras de colágeno de la lamina propia y se ilustra en el segmento 5 como bajo (A), moderado (B) o alto (C).

La figura 7 muestra microfotografías de los tres compartimentos vaginales: (E) el epitelio, (L) lamina propia y (M) *muscularis*, al nivel del quinto segmento de la vagina de la rata con énfasis en el espesor del *muscularis* relativo en los grupos diferentes. La separación de las 3 capas de las paredes vaginales con barras se indica para la estimación óptima de la distribución de espesor entre los grupos diferentes. A) Intacto, B) OVX, y OVX tratados con C) Acolbifeno, D) Premarin, E) Premarin + Acolbifeno, F) DHEA, G) DHEA + Acolbifeno, H) DHEA + Premarin, I) DHEA + Premarin + Acolbifeno.

La figura 8 muestra el peso vaginal medido 36 semanas después de OVX y el tratamiento de animales OVX con Acolbifeno, Premarin y DHEA solo o en combinación. Se agregan los animales intactos como controles.

La figura 9 muestra la localización Inmunohistoquímica de AR, $Er\alpha$ y PR en (A) epitelio, (B) lamina propia y (C) *muscularis* a nivel del quinto segmento vaginal de los grupos diferentes. Las barras indican la separación entre los tres compartimentos vaginales.

Las figuras 10 y 11 muestran la comparación entre diferentes SERMs : morfología epitelial vaginal, en las ratas.

La figura 12 muestra la fotografía de una diapositiva de microscopio para desplegar el posicionamiento de los 8 segmentos vaginales (toda la fila superior y la sección de la esquina inferior derecha),
5 seguido por los 4 segmentos uterinos (1 segmento de cuello uterino y 3 segmentos de las dos trompas uterinas - 2 secciones por trompa) en una secuencia que corresponde a su posición anatómica original. El segmento 8 incluye los pliegues vaginales laterales que circundan el principio
10 del cérvix uterino.

La figura 13 muestra el efecto la rata intacta Al estrus (columna izquierda), el epitelio vaginal es de un espesor de 12 -18 capas en el segmento de espesor de 4 y 12-15 capas en el segmento 6.

15 En el metestrus (columna correcta), el epitelio vaginal despliega de 6 a 10 capas celulares en el segmento 4, y 5 a 7 capas en el segmento 6.

La figura 14 muestra el efecto OVARECTOMIZADO

Ratas INTACTAS. En EL segmento 4, la vagina está
20 revestida por un epitelio escamoso estratificado de 2 a 6 capas celulares. En el segmento 6, se observa la atrofia completa, con 2 a 3 capas celulares planas. Algunos focos raros de células mucosas cilíndricas pequeñas podrían verse a lo largo de toda la vagina.

La figura 15 muestra el efecto del placebo/supositorio. Comparado con el grupo intacto OVX, los epitelios escamosos vaginales estratificados del grupo del placebo eran ligeramente más espeso, con el
5 segmento 4 que despliega de 4 a 8 capas celulares. En el segmento 6, fue observada la misma morfología como el de grupo intacto OVX, con 2-3 capas celulares epiteliales. Los focos de las células mucosas cilíndricas pequeñas podrían encontrarse a lo largo de la vagina, ligeramente
10 más que cuando se comparó con los animales intactos OVX.

La figura 16 muestra el efecto de DHEA 0.33 mg / supositorio. En el segmento 4, el epitelio vaginal es escamoso estratificado con 3 a 7 capas celulares. Aproximadamente 20 a 60% del revestimiento vaginal
15 consiste en células mucosas bien-alineadas alternando con 15 a 50% células mucosas hiperatrofiadas, revistiendo una o más capas de epitelio escamoso estratificado, y con las áreas no-mucificadas. En el segmento 6, el espesor epitelial se reduce casi al espesor encontrado en los
20 animales intactos OVX: 2-5 capas celulares recubiertas por las células mucosas cilíndricas. Se observó una variación considerable en la ocurrencia de las células mucosas, estas células que cubren de 5 a 75% de la superficie vaginal, alternando con las áreas no-mucificadas.

000090

La figura 17 muestra el efecto de DHEA 0.66 mg/supositorio. En el segmento 4, el epitelio escamoso estratificado es de un espesor de 3 a 6 capas celulares. Aproximadamente del 5 al 20% del revestimiento vaginal
5 consiste en células mucosas bien alineadas alternando con 10 a 75% de células mucosas hiperatrofiadas, interponiéndose a una o más capas de epitelio escamoso estratificado. También están presentes las áreas epiteliales no mucificadas. En el segmento 6, el espesor
10 epitelial está reducido y consiste en un epitelio escamoso estratificado de 2 a 4 capas celulares, sobremontado por una capa de células mucosas bien-alineadas. Las áreas mucificadas variaron de 20 a 80% de la superficie vaginal, alternando con las áreas no mucificadas.

15 La figura 18 muestra el efecto de DHEA 1 mg/supositorio. En el segmento 4, el epitelio del escamoso estratificado despliega 3 a 9 capas celulares. Las células mucosas hipertrofiadas los 3 a 4 escamoso inferiores las capas celulares cubren 50 a 70% de la superficie vaginal,
20 mientras las células mucosas bien-alineadas revisten del 5 a 30% de la superficie vaginal. Las áreas no mucificadas se esparcen a intervalos entre las células mucificadas. En el segmento 6, el espesor epitelial está también reducido y consiste de 2 a 4 capas celulares. Las células mucosas
25 hipertrofiadas que recubren 1 a 3 capas celulares

escamosas inferiores cubren de 30 a 100% de la superficie vaginal aproximadamente mientras las células mucosas bien alineadas cubren de 0 a 70%. También se observan algunas áreas esparcidas no mucificadas.

5 La figura 19 es una gráfica del efecto en el peso corporal del tratamiento de 14 días con DHEA (supositorio) aplicado intravaginalmente en las ratas de OVX. Comparó con el grupo de placebo, el peso corporal de los grupos dosificados con DHEA ligeramente a las dosis de 0.33 mg y
10 0.66 mg ligeramente disminuidas, mientras la disminución era más pronunciada en el grupo de 1 mg.

La figura 20 es un gráfico de concentración de suero de DHEA después de la aplicación intravaginal de 0.33 mg, 0.66 mg o 1 mg a las ratas OVX. La zona bajo los
15 valores de la curva (AUC) siete horas seguidas del tratamiento de DHEA sea 32 ± 4 ng.h/ml, 50 ± 7 ng.h/ml y 131 ± 23 ng.h/ml cuando DHEA se dio a las dosis de 0.33 mg, 0.66 mg o 1 mg, respectivamente.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Después de la cesación de secreción del estrógeno por los ovarios a la menopausia, se sintetizan prácticamente todos los andrógenos y estrógenos en los tejidos objetivo periféricos por medio de los mecanismos
25 intracrina de la dehidroepiandrosterona (DHEA), de origen

suprarrenal. De hecho, en la ausencia de estrógenos ováricos, la disminución gradual en DHEA en suero es probable que frecuentemente juegue un papel importante en la sequedad vaginal, inflamación, dispareunia y trastorno sexual asociado con la menopausia. Para evaluar el estrogénico específico y/o los efectos androgénicos de una nueva terapia de reemplazo de hormonas potencial que podrían, entre otros efectos beneficiosos, aliviar la sequedad vaginal, nosotros hemos examinado la morfología de la vagina de la rata ocho meses después de la ovariectomía (OVX) y el tratamiento de animales OVX con DHEA, los estrógenos conjugados (Premarin) y el modulador receptor de estrógeno selectivo Acolbifeno, administrado solo o en combinación. En los animales intactos en el periodo estrus y en ratas de OVX tratadas con Premarin, el patrón estrogénico vaginal típico es un epitelio escamoso keratinizado estratificado. OVX condujo a una atrofia general asociada con los cambios inflamatorios, mientras Acolbifeno redujo la incidencia de inflamación y aumentó el número y tamaño de células mucosas en el epitelio vaginal. A las dosis utilizadas, Premarin invirtió completamente la atrofia epitelial inducida por OVX, mientras DHEA invirtió la atrofia parcialmente. De hecho, el epitelio vaginal de animales OVX tratados con DHEA se volvieron hiperplásicos con 3-5 capas de mucosa columnar

000093

y células calciformes típicas de un efecto androgénico. La adición de Premarin a DHEA llevó a un epitelio más espeso que en los animales intactos. Es más, la compacidad de las fibras de colágeno en la lamina propria se aumentó por DHEA. Por otro lado, el tratamiento con Acolbifeno solo

5 mostró una tendencia para el aumento en el espesor de lamina propria que alcanzó los valores intactos cuando se combinó con DHEA.

Después de OVX, la capa muscular vaginal se

10 disminuyó al 46%, un efecto que fue 41% y 100% invertido por DHEA y Premarin, respectivamente. Por otro lado, la disminución de 50% en el espesor de la pared vaginal total OVX siguiente era 42% y 93% invertidos por DHEA y Premarin, respectivamente, mientras la combinación de DHEA

15 y Acolbifeno no invirtió el total el espesor de la pared vaginal a un valor significativamente diferente de los animales de control intactos.

La inmunohistoquímica reveló un receptor andrógeno fuerte (AR) etiquetando en todos los grupos

20 tratados con DHEA. Por otro lado, no se detectó etiquetado de alfa receptor de estrógeno ($Er\alpha$) y receptor de progesterona (PR) en ninguno de los grupos tratados con Acolbifeno.

En conclusión, el tratamiento con DHEA o la

25 combinación de DHEA y Acolbifeno previene parcial o

completamente los cambios atróficos inducidos por OVX observados en varias capas de la pared vaginal a través de un efecto androgénico predominante, como es revelado por la mucificación epitelial y sobre regulación de AR. Los

5 datos presentes también muestran efectos particularmente interesantes de DHEA en las tres capas de la pared vaginal, a saber un epitelio altamente mucificado, un tamaño reducido aumentado de las fibras de colágeno en la *lamina propria* así como un aumento del espesor del

10 *muscularis*. DHEA ejerce ambos así un efecto androgénico y estrogénico en la mucosa vaginal, mientras proveyendo así una terapia de reemplazo más fisiológica. Aunque cada uno de los compuestos examinados tiene los efectos beneficiosos potenciales en la función vaginal, DHEA solo

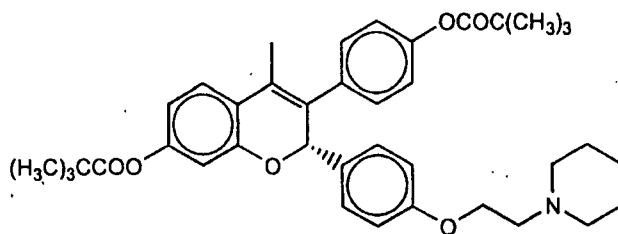
15 o en combinación podría bien aliviar óptimamente la sequedad vaginal y podría restaurar la fisiología vaginal global y ayudar a corregir la disfunción sexual asociada con la menopausia. Podrían administrarse DHEA y otros componentes localmente o sistémicamente.

20 Un modulador receptor de estrógeno selectivo de la invención tiene una fórmula molecular con los siguientes rasgos: a) dos anillos aromáticos espaciados por 1 a 2 átomos de carbono intermedios, ambos anillos aromáticos que son no sustituidos o sustituidos por un

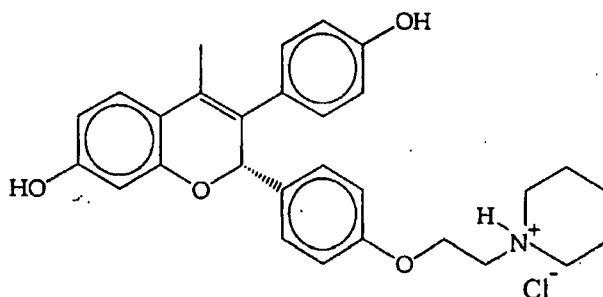
25 hidroxilo del grupo o grupo convertido *in vivo* a

hidroxilo; y b) una cadena lateral poseyendo un anillo aromático y una función terciaria aminada o sal de la misma.

Un SERM preferido de la invención es EM-800 reportado en PCT/CA96/00097 (WO 96/26201) La estructura molecular de EM-800 es:



Otro SERM preferido de la invención es Acolbifeno (EM-1538, también llamado EM-652.HCl) reportado en EUA 6,710,059 B1)



es la sal clorhidrato del antiestrógeno potente EM-652. Comparado con EM-800, EM-1538 es una sala más segura, más simple, y más fácil de sintetizar. Se cree que produce el mismo compuesto activo *in vivo* administrando EM-800 o EM-1538.

Otro SERM preferido es Lasoxifeno (CP-336,156; (-)-cis-(5R,6S)-6-fenil-5-[4-(2-pirrolidin-1-

iletoxi)fenil]-5,6,7,8- tetrahidronaftalen-2-ol, D-(-)-sal tartrato) (disponible de Pfizer Inc., EUA).

Otros SERMs preferidos de la invención incluyen Tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)]-N,N-
 5 dimetiletanamina) (disponible de Zeneca, Reino Unido), Toremifeno (disponible de Orion-Farmos Pharmaceutica, Finlandia, ó Schering-Plough), Droloxifeno, y Raloxifeno (Eli Lilly and Co., EUA), Arzoxifeno (LY 335563) y LY 353381 (Eli Lilly and Co., EUA), Ospemifeno (FC 1271)
 10 (disponible de Orion-Farmos Pharmaceutica, Finlandia), Yodoxifeno (SmithKline Beecham, EUA), Levormeloxifeno (3,4-trans- 2,2-dimetil-3-fenil-4-[4-(2-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)fenil]-7- metoxicromano) (Novo Nor disk, A/ S, Dinamarca) que se describe en Shalmi et al. WO 97/25034,
 15 WO 97/25035, WO 97/25037, WO 97/25038 _i_ y Korsgaard et al. WO 97/25036), GW- 5638 (descrito por Willson et al., 1997, Endocrinol, 138(9): 3901- 3911), SERM 3339 en desarrollo por Aventis (Francia) y derivado de indol (descrito por Miller et al. EP 0802183A1) y TSE-424 y ERA-
 20 923 desarrollado por Wyeth Ayers (EUA) y descrito en JP1 0036347 (American home products corporation) y derivados de estrógeno no esteroides descritos en WO 97/32837.

Puede utilizarse cualquier SERM utilizado como se requiere por eficacia, como es recomendado por el

fabricante. Las dosificaciones apropiadas son conocidas en la técnica. Cualquier otro antiestrógeno no esteroide comercialmente disponible puede utilizarse según la invención. Puede utilizarse cualquier compuesto que tenga una actividad similar a los SERMs (ejemplo: Raloxifeno).

Los SERMs administrados de acuerdo con la invención, se administran preferentemente en un rango de dosificación entre 0.01 a 10 mg/kg al día de peso corporal (preferentemente de 0.05 a 1.0 mg/kg), con 10 mg por día, sobre todo 20 mg por día, en dos dosis igualmente divididas que se prefieren para una persona de medio peso del cuerpo cuando oralmente administró, o en un rango de la dosificación entre 0.003 a 3.0 mg/kg al día de peso corporal (preferentemente de 0.015 a 0.3 mg/ml), con 1.5 mg por día, sobre todo 3.0 mg por día, en dos dosis igualmente divididas que se prefieren para una persona de peso corporal promedio cuando se le administre paternalmente (es decir, administración intramuscular, subcutánea o percutánea). Preferentemente los SERMs se administran junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable como se describe debajo.

El inhibidor preferido de GMPc-fosfodiesterasa de tipo 5 es Sildenafil comercializado bajo el nombre comercial de "Viagra" por Pfizer EUA, Tadalafil comercializado bajo el Nombre comercial "Cialis" por Eli

3

Lilly EUA, vardenafil comercializado bajo el nombre comercial "Levitra" por Bayer (Alemania). También se prefiere el inhibidor de GMPcfsfodiesterasa de tipo 5 que está actualmente en desarrollo: DA-8159 por Dong-A Pharm
5 Tech (Corea del Sur), EMR-62203 por Merck (Alemania), TA-1790 por Tanabe Seiyaku (Japón), SCH-446132 por Schering-Plough (EUA), y Reino Unido-371800 por Pfizer (EUA).

La prostaglandina preferida es alprostadil comercializada bajo el nombre comercial "Alprox-TD" por
10 NexMed (EUA).

Con respecto a todas las dosificaciones recomendadas en la presente invención, el médico que atiende debe supervisar la respuesta individual del paciente y debe ajustar la dosificación de acuerdo con lo
15 anterior.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

20

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

Se utilizaron ratas hembra de diez a doce semanas de edad Sprague-Dawley (Cr1:CD®(SD)Br VAF/Plus™) (Charles
25 River Laboratory, St-Constant, Canadá) pesando

000099

aproximadamente 220-270g al inicio del experimento. Los animales se aclimataron a las condiciones ambientales (temperatura: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humedad: $50 \pm 20\%$; ciclos de luz 12-h día - 12-h oscuridad, luces encendidas a las 07:15h) durante por lo menos una semana antes de empezar el experimento. Los animales fueron alojados individualmente y se les permitió el acceso libre para beber agua y se les indicó alimentos para roer (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO). El experimento se condujo de acuerdo con la Guía CCAC para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales en una instalación de animales aprobada por el Consejo Canadiense para el Cuidado de los Animales (CCAC) y la Asociación para Valoración y Acreditamiento de Cuidados de Animales de Laboratorio (AAALAC).

Un total de 126 ratas hembra se distribuyeron al azar en 9 grupos de 14 animales cada uno, como sigue: 1) control Intacto; 2) control Ovariectomizados (OVX); 3) OVX + Acolbifeno (2.5 mg/kg); 4) OVX + Premarin (0.5 mg/kg); 5) OVX + Premarin + Acolbifeno; 6) OVX + DHEA (80 mg/kg); 7) OVX + DHEA + Acolbifeno; 8) OVX + DHEA + Premarin; 9) OVX + DHEA + Acolbifeno + Premarin. En el primer día del estudio, los animales de todos los grupos (excepto grupo uno) fueron bilateralmente ovariectomizados (OVX) bajo anestesia inducida por isoflurano, Premarin y Acolbifeno fueron administrados por sonda (0.5 ml/rata) como

41

suspensiones en 0.4% metilcelulosa mientras que se aplicó tópicamente DHEA en 50% etanol-50% propilenglicol (0.5 ml/rata), en una área afeitada de 2 x 2 centímetros de la piel dorsal. La selección de la dosificación para

5 Premarin corresponde a la dosis mínima suficiente para invertir la atrofia uterina inducida por OVX, mientras se administró Acolbifeno a una dosis suficiente para causar la atrofia uterina similar a OVX después de su administración a los animales de OVX tratados con

10 Premarin. La dosis de DHEA utilizada dio los niveles sanguíneos de DHEA a 70-100 nmoles/L. Se comenzaron los tratamientos en el día 2 del estudio y los compuestos se administraron diario una vez durante 36 semanas. Los animales de los grupos de control intacto y OVX recibieron

15 exclusivamente el vehículo.

Veinticuatro horas después de la última dosificación, los animales ayunados durante la noche fueron sacrificados bajo anestesia de isoflurano por el desangramiento en la aorta abdominal (9 animales por

20 grupo) o por perfusión intracardiaca con 10% de formalina regulada con pH neutro (5 animales por grupo). Se recolectaron las vaginas de los animales no perfusionados y se pesaron, mientras las vaginas recolectadas de los animales perfusionados eran marcado con tinta negra en el

lado ventral, y entonces se pelaron como se describe abajo.

Procedimientos histológicos

5 La vagina entera de cada animal perfusionado se post-fijó en 10% de formalina regulada con pH neutro. Cada vagina se dividió entonces en siete segmentos transversales iguales, tal como se ilustra en la figura 1, rutinariamente se procesaron e integraron juntas en el
10 mismo bloque de parafina. Dentro del bloque de parafina, los siete segmentos cilíndricos vaginales se posicionaron en una sucesión que corresponde a su posición anatómica original y perpendicularmente orientadas a la superficie del bloque, permitiendo cortar así los segmentos en
15 sección transversal. Para cada animal, se cortó una sección de parafina de 4 µm de espesor y se tiñó con hematoxilín-eosina para el examen morfológico.

Histomorfometría

20 Se realizaron medidas de las diferentes capas vaginales en el quinto segmento (figura 1) que es aproximadamente a la mitad entre la región media y el *portio vaginalis uteri* (porción útero vaginal) (segmento 7). Este quinto segmento fue encontrado para desplegar una
25 superficie epitelial representativa y un espesor

suficiente de músculo liso. Se capturaron imágenes con una cámara de color DC-330 3CCD (Dage-MTI, Ciudad de Michigan, IN, EUA) y se cuantificaron utilizando Image-Pro software 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Así, 5 utilizando un lente x5 (Leica Microsystems, Willowdale, Ontario, Canadá), se obtuvieron medidas de 3 a 4 de espesor por capa de las áreas representativas del epitelio y *muscularis*, y para las tres capas vaginales juntas. Se midieron entonces el espesor vaginal total, el espesor del 10 epitelio y el espesor del *muscularis*. Se obtuvo el espesor de la *lamina propria* substrayendo el espesor del epitelio y *muscularis* del espesor vaginal total.

Immunohistoquímica

15 Se desarrolló el inmunoteñido utilizando equipos (kits) de Zymed SP (San Francisco, CA). Las secciones de parafina (4 μ m) se desparafinizaron en tolueno y se rehidrataron a través de etanol. La actividad de peroxidasa endógena se eliminó por preincubación con 3% 20 H₂O₂ en metanol durante 30 min. Se aplicó una técnica de recuperación de microondas que utiliza regulador de citrato (Tacha y Chen, 1994). Después de enfriar las diapositivas, se bloqueó la no unión específica utilizando suero de cabra al 10% durante 20 min. Se incubaron las 25 secciones entonces durante 1.5 h a la temperatura

000103

ambiental con Er α (AB-1, Calbiochem, California), AR (N-20, Santa Cruz Biotechnology, California) o PR (Ab-4, NeoMarkers, California) anticuerpos, a 1:200, 1:250 y 1:250 respectivamente. Se incubaron las secciones con anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado durante 10 min después de lavar en el regulador de PBS, y después de esto con estreptavidin-peroxidasa durante otros 10 min. Se utilizó diaminobencidina como el cromógeno para visualizar el complejo biotin/estreptavidin-peroxidasa, bajo supervisión del microscopio. Se realizó un contrateñido utilizando hematoxilina de Gill #2 por 30 seg. Para los controles, se realizó inmunoabsorción con un exceso del péptido utilizado para elevar el anticuerpo, o substitución con IgG de conejo no inmune. La evaluación semicuantitativa del número e intensidad de núcleos inmunoteñidos se realizó como se indica en la Tabla 2.

TABLA 1

Evaluación histológica del epitelio, lamina propria y muscularis en los siete segmentos vaginales de la rata

Grupo		Par ede s vag ina les	Segm ento 1	Segm ento 2	Segm ento 3	Segm ento 4	Segm ento 5	Segm ento 6	Segm ento 7
Int act o	Estru s	E L M	KS T-L s	KS t-L s	KS t-L t	KS t-M M	KS M-M T	KS M-M T	KS M-M T
	Proge	E	KS	MSM-	MSM	MSM	MSM-	MSM-	MSM

	strus	L M	T-M s	KS t-M s	t-M t	t-M M	KS I-M M	KS M-M T	-KS M-M T
	Contr ol	E L M	A t-H s	A t-M s	A t-H t	A t-H t	A t-H t	A M-M t	A M-H M
	Acolb ifeno	E L M	KS M-M S	SCM- A t-M s	SCM- A t-H s	SCM- A t- H s	SCM- A t- H t	SCM- A t- H t	SCM- A M- H t
	Prema rin	E L M	KS M-L s	KS- MSM t-M s	KS- MSM t-M t	KS- MSM M-M M	KS- MSM M-M T	KS M-H T	KS T-H T
	Prema rin + Acolb ifeno	E L M	KS M-M s	A- SCM t-M s	SCM- A t- H t	SCM- A t- H t	SCM- A M-M t	SCM- A M-M t	SCM- A M-M M
OVX	DHEA	E L M	KS- LHM M-H s	LHM t-H s	LHM t-H s	LHM t-H t	LHM t-H M	LHM- SCM M-H M	LHM- SCM M-H M
	DHEA + Acolb ifeno	E L M	KS- LHM- SCM M-M s	SCM- LHM t-M s	SCM- LHM t-H s	SCM- LHM t-H t	SCM- LHM M-H t	SCM- LHM M-H M	LHM- SCM M-H M
	DHEA + Prema rin	E L M	KS M-M s	MSM- KS t-L	MSM- KS t-M t	MSM- KS t-M M	MSM- KS M-H T	KS M-M T	KS M-H T
	DHEA + Prema rin + Acolb ifeno	E L M	KS M-M S	SCM- LHM- KS M-H s	SCM- LHM t-H s	SCM- LHM M-H t	SCM- LHM t-H M	SCM- LHM M-H M	LHM- SCM M-M M

E= Morfologia del epitelio: KS (escamoso estratificado keratinizado), LHM (grandes células mucosas hipertrofiadas),

5 SCM (pequeñas células mucosas cuboidales o columnares alineadas), MSM (escamoso estratificado mixto recubierto por células mucosas),

A (atrofia: pequeñas células cuboidales).

Dos abreviaciones diferentes para un segmento dado indican dos patrones diferentes y que el primero es predominante.

'L = espesor de lamina propria: T (gruesa), MT (ligeramente gruesa), t (delgada): Tamaño reducido (compacidad) de las fibras de colágeno: H (alta),

M (moderada), L (baja);

5 M = espesor del *muscularis*: el T (espeso), MT (ligeramente espeso), t (delgado), s (escaso).

000106

27

TABLA 2

Evaluación semicuantitativa del número e intensidad de núcleos inmunoteñidos para AR, alfa de ER y PR en el epitelio, lamina propria y muscularis en el quinto

5	Receptor de esteroides sexuales		AR			ER*			PR		
	Capa vaginal		E	L	M	E	L	M	E	L	M
	Grupo										
10	Int act o	Referencia estrus de ER alto y PR bajo	2 ++	2 +++	1 +	1 +	1 +	3 +	2 +++	3 +++	3 +++
		Referencia diestrus de ER* alto y PR bajo	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++	1 ++	1 +	0	2 ++	2 ++
		Control	1 +	1 +++	1 +++	2 ++	1 +++	1 +++	0	0	0
		Acolbifeno	2 ++	1 +++	1 +++	0	0	0	0	0	0
		Premarin	2 ++	2 +++	1 +	2 ++	3 ++	3 ++	2 ++	2 +++	3 +++
		Premarin + Acolbifeno	2 ++	1 +	1 +	0	0	0	0	0	0
15	OVX	DHEA	3 +++	3 +++	3 +++	2 ++	2 +++	3 +++	0	0	1 ++
		DHEA + Acolbifeno	3 +++	3 +++	3 +++	0	0	0	0	0	0
		DHEA + Premarin	2 +++	3 +++	3 +++	2 +	2 +++	3 +++	2 ++	2 +++	3 +++
		DHEA + Preamarin + Acolbifeno	3 +++	3 +++	3 +++	0	0	0	0	0	0

-- El receptor andrógeno (AR), alfa receptor estrógeno (ER α), receptor de progesterona, (PR), epitelio (E), *lamina propria* (L), *muscularis* (M).

- Los números representan la evaluación semi-cuantitativa de los núcleos etiquetados: 0=ninguno, 1=bajo, 2=moderado, 3=alto

5 - La intensidad de etiquetado se indica como bajo: +, moderado: ++ y alto: +++

Análisis estadístico

Los Datos se presentan como media $\pm$ SEM de 8-9
animales por grupo para peso vaginal o 5 animales por
10 grupo para las determinaciones de espesor de la capa
vaginal. La importancia estadística se determinó según la
prueba del rango múltiple de Duncan-Kramer (Kramer, 1956,
Biometrics, 12: 307-310).

RESULTADOS

15 Morfología y espesor de las diferentes capas de la vagina
de la rata

Para examinar con precisión y detallar las tres
capas de la pared vaginal de la rata, a saber, el
epitelio, *lamina propria* y *muscularis*, se examinaron
20 primero siete segmentos se obtuvieron a lo largo del eje
longitudinal (figura 1). Mientras se observaron las
diferencias morfológicas importantes entre los grupos, en
general, que las diferencias fueron uniformes en todos los
animales del mismo grupo y segmentos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 han

mostrado a una morfología epitelial similar. Se mencionarán las pocas excepciones observadas después. El segmento 5 fue utilizado para ilustrar el efecto de los varios tratamientos en el epitelio vaginal.

5 En el grupo OVX, la ausencia de estímulo ovárico llevó a una atrofia del epitelio vaginal que caracterizó todos los segmentos (Tabla y figura 2c) con la presencia, de algunas áreas de la célula mucosas pequeñas. De manera importante un hallazgo frecuente era una inflamación de
10 moderada a severa con muchos focos de microabsceso intraepitelial (áreas pequeñas de leucocitos aglomerados dentro del epitelio). Estos cambios frecuentemente se acompañaron por la erosión focal (zonas donde la capa epitelial desaparece parcialmente) y ulceración
15 (desaparición completa de la capa epitelial) (Figura 3).

 En animales OVX tratados con Acolbifeno, el segmento 1 mostró un epitelio escamoso queratinizado estratificado similar a al del grupo intacto, sólo que incluyó 9-11 capas celulares comparadas a las 10-15 capas
20 encontradas en los animales al estrus o cuando los animales de OVX recibieron Premarin (figura 4). El espesor epitelial de animales tratados con Acolbifeno en el segmento 1, fue entonces más alto que el de ratas OVX que comprendieron sólo 4-6 capas celulares. En los otros
25 segmentos (Tabla 1), la capa basal se cubrió por una capa

de células mucosas columnares bajas (figura 2D), qué se desarrolló más que en los animales OVX. En el grupo OVX + Acolbifeno, sólo tres de cinco animales mostraron señas de inflamación mínima mientras que cambios inflamatorios de moderados a severos fueron los hallazgos generales en todos los animales de OVX.

En todos los grupos, el segmento 1 mostró un epitelio escamoso estratificado comparable, excepto en los animales del grupo OVX donde la atrofia era una característica predominante (figura 4). Es más, en los grupos OVX + DHEA y OVX + DHEA + Acolbifeno, células mucosas frecuentemente acompañadas del epitelio escamoso estratificado dominante del segmento 1 (no mostrado).

Los siete segmentos del epitelio vaginal de animales OVX que recibieron DHEA estaban compuestos de grandes células mucosas columnares de capas múltiples con vacuolas citoplásmicas distendidas, un rasgo típico de un efecto androgénico (Tabla 1, figura 2G). Varias invaginaciones grandes caracterizaron el epitelio después del tratamiento con DHEA. Una morfología epitelial similar se encontró en todos los segmentos de control OVX + DHEA + Acolbifeno, sólo que el tamaño de las células mucosas y el número de sus capas fue disminuido (Tabla 1, figura 2H). En los animales tratados con DHEA + PREMARIN-, se observó

un epitelio estratificado grueso de un" tipo mixto" compuesto de proporciones diferentes de epitelio escamoso cubiertas por las capas de células mucosas (Tabla 1, figura 21) del segundo al quinto segmento, mientras 5 revelaba efectos androgénicos y estrogénicos combinados. En este grupo, tres animales desplegaron mucificación sobre los segmentos antedichos, mientras en los otros dos animales, se observó un epitelio escamoso estratificado en todos los segmentos (Tabla 1). Cuando PREMARIN se combinó 10 con DHEA y Acolbifeno, el epitelio era similar al del grupo DHEA + Acolbifeno, indicando así un bloqueo de proliferación celular escamosa estrógeno-inducida por Acolbifeno (Tabla 1 e Figura 2J).

La administración de DHEA a los animales OVX 15 aumentó el espesor del epitelio vaginal a $38 \pm 4 \mu\text{m}$, mientras la adición de Acolbifeno a la DHEA no cambió el espesor epitelial que permanecía a $37 \pm 5 \mu\text{m}$. Cuando Premarin y DHEA se coadministraron a los animales OVX, se observó un espesor alto de $84 \pm 6 \mu\text{m}$, un valor no 20 significativamente diferente del grupo de animales que recibieron Premarin exclusivamente. Finalmente, la combinación de Premarin, DHEA y Acolbifeno producían un epitelio de $32 \pm 3 \mu\text{m}$ de espesor, un valor similar al de los grupos que recibieron DHEA solo o DHEA combinada con 25 Acolbifeno.

Lamina propria

El grado de tamaño reducido (compacidad) de las fibras de colágeno en la vagina se categorizó como bajo, moderado y alto (figura 6), como se observa en el área proximal al epitelio. Tamaño reducido o compacidad «Bajo/a» y «moderado/a» se asoció aproximadamente con la presencia de fibras de colágeno gruesas o agregadas menos aproximadamente y juntas, respectivamente; mientras «alta compacidad» era el término utilizado para describir las fibras de colágeno finas herméticamente condensadas, desplegando una apariencia lisa y texturizadas. En todos los animales, había relativamente pocos fibrocitos a medida de la cantidad de colágeno, y parecían predominantemente aplanados y encogidos.

El examen cuidadoso de cada animal (Tabla 1) revela que, en general, la compacidad de las fibras de colágeno en el segmento 1 es moderada (excepto: bajo en las ratas al estrus y en los animales OVX tratados con Premarin, o alto en OVX y ratas OVX tratadas con DHEA, aumentando así la compacidad en los segmentos 2 y 3 para alcanzar una meseta que generalmente permanece constante hasta el segmento 7. Así, a lo largo del eje longitudinal de la vagina en las ratas intactas al estrus, la compacidad de las fibras de colágeno era baja en los

segmentos 1 a 3 y moderada en los segmentos 4 a 7. La atrofia a menudo estaba asociada con la compacidad aumentada de fibras de colágeno en los grupos OVX y OVX + Acolbifeno (Tabla 1). En los animales OVX *Tratados con*
5 *Premarin*, la compacidad en el segmento 1 era baja y moderada en los segmentos 2 y 3, mientras en los otros segmentos, la compacidad de las fibras de colágeno aumentó para elevarse en los segmentos 6 y 7 gradualmente.

El examen de microscopio de luz visual del
10 espesor de *lamina propria* a lo largo de la vagina generalmente reveló que era ligeramente grueso en el segmento 1 mientras más delgado en los segmentos 2 a 4. En los segmentos 5 a 7, el espesor aumentó progresivamente a un nivel similar en el segmento 1. Los valores medios
15 correspondientes de espesor de *lamina propria* medidos en el segmento 5 (*Figura 5B*) indican que OVX condujo a una disminución significativa en el espesor de *lamina propria* ($76 \pm 2\mu\text{m}$ contra $135 \pm 28\mu\text{m}$ en el grupo intacto) con una disminución no significativa inducida por Acolbifeno ($60 \pm$
20 $8\mu\text{m}$). El aumento observado después de la administración de Premarin o Premarin + Acolbifeno en animales OVX permaneció debajo del grupo intacto ($100 \pm 9\mu\text{m}$ y $90 \pm 3\mu\text{m}$, respectivamente contra $135 \pm 28\mu\text{m}$). La administración de DHEA también condujo a un aumento estadísticamente no
25 significativo en el espesor de la *lamina propria* ($96 \pm 20\mu$

m), y la suma de Acolbifeno condujo a un espesor aumentado extenso ($136 \pm 17\mu\text{m}$), alcanzando lo de los animales intactos. El tratamiento de animales de OVX con Premarin + DHEA aumentó el espesor significativamente, ($144 \pm 14\mu\text{m}$)
5 comparado exclusivamente con DHEA. Finalmente, los animales tratados con Premarin + DHEA + Acolbifeno mostraron un espesor ($99 \pm 9\mu\text{m}$) similar al del grupo tratado con DHEA solamente, y más bajo que el del grupo Premarin + DHEA, aunque la diferencia no era
10 estadísticamente significativa.

DHEA indujo un aumento moderado en el espesor del *muscularis* ($50 \pm 2 \mu\text{m}$) que se disminuyó ligeramente por la adición de Acolbifeno ($41 \pm 3 \mu\text{m}$). Finalmente, el tratamiento con Premarin y DHEA combinado dio como
15 resultado un aumento en grosor notable ($62 \pm 3 \mu\text{m}$), comparado con animales tratados exclusivamente con DHEA. Cuando se agregó Acolbifeno a Premarin y DHEA, el espesor del *muscularis* disminuyó ($46 \pm 5 \mu\text{g}$) a un valor comparable a DHEA y Acolbifeno.

20 Cuando se midió el espesor total de la pared vaginal (figura 5D), no se incluyó la capa delgada exterior de tejido conectivo que componía la adventitia. OVX condujo a una atrofia de la pared vaginal (51%) ($128 \pm$

3µm, contra $262 \pm 39\mu\text{m}$ en el intacto) y la adición de Acolbifeno no tuvo efecto ($108 \pm 8\mu\text{m}$) (figura 7A, B y C). El tratamiento con Premarin mantuvo el espesor total a un valor ($253 \pm 10\mu\text{m}$) similar al de los animales intactos
5 mientras la adición de Acolbifeno a Premarin invirtió el efecto de Premarin ($150 \pm 4\mu\text{m}$) (figura 7D y E, respectivamente). El espesor vaginal total logrado por el tratamiento de DHEA ($184 \pm 21\mu\text{m}$) fue aproximadamente 25% menor que el del grupo tratado solamente con Premarin
10 (figura 7F). Por otro lado, la adición de Acolbifeno a DHEA condujo a un incremento de espesor no significativo ($213 \pm 20\mu\text{m}$) que se volvió no significativamente diferente del grupo intacto (figura 7G). Finalmente, la coadministración de Premarin y DHEA a los animales OVX
15 incrementaron marcadamente el espesor notablemente ($290 \pm 13\mu\text{m}$) a un valor similar al de los animales intactos (figura 7H). La adición de Acolbifeno a DHEA y Premarin invirtieron el efecto a un valor ($176 \pm 11\mu\text{m}$) no significativamente diferente de DHEA solamente (figura
20 7I).

Peso vaginal

Después ocho meses de tratamiento, los cambios observados en el peso vaginal entre los diferentes grupos (figura 8) generalmente siguen las observaciones

morfológicas anteriormente descritas. De hecho, el peso vaginal después de OVX disminuyó alrededor del 50% (101 ± 5 mg) comparado con el grupo intacto (205 ± 11 mg) mientras el tratamiento de animales con Acolbifeno no tuvo efecto en el peso vaginal. Por otro lado, la administración de Premarin condujo a un incremento en el peso vaginal que no alcanzó el valor de los animales intactos (170 ± 9 mg) mientras que la adición de Acolbifeno a Premarin invirtió la ganancia en peso inducida por estrógeno a un valor similar al de los animales OVX (96 ± 4 mg). Por el contrario, cuando se administró DHEA a los animales OVX, el peso vaginal incrementó un valor (171 ± 12 mg), similar al del grupo tratado con Premarin, y la combinación de Acolbifeno y DHEA resultó en una disminución en peso (135 ± 9 mg) que se mantuvo por encima del grupo OVX. Finalmente, la coadministración de Premarin y DHEA en animales OVX resultó en una ganancia de peso vaginal (179 ± 10 mg) alcanzando un valor similar a aquéllos de los grupos OVX + DHEA y OVX + Premarin. La adición de Acolbifeno a esta combinación no tuvo efecto significativo (194 ± 12 mg).

El tratamiento de DHEA de animales OVX condujo al considerable etiquetado o AR de muchos núcleos en las tres capas vaginales, donde se encontró el mismo patrón cuando se usaron las combinaciones de DHEA + Acolbifeno y DHEA +

Premarin, con la excepción de un número menor de núcleos etiquetados en las capas superficiales del epitelio en el grupo posterior. La combinación de DHEA, Premarin y Acolbifeno también resultaron en un fuerte teñido en la mayoría de los núcleos en las tres capas de la pared vaginales.

DISCUSIÓN

La sequedad vaginal o vaginitis atrófica, también referido como atrofia urogenital, con disfunción sexual es un problema común en las mujeres post-menopáusicas (Notelovitz, 2000, Menopause, 7(3): 140 - 142). Los síntomas más son sequedad, quemazón, prurito, irritación y dispareunia, conduciendo así a la disminución la libido y la calidad de vida (Berman et al., 1999, Curr Opin Urol, 9(6): 563-568). Como se sabe que hay una pérdida de estrógeno involucrada, la terapia de reemplazo de estrógeno (ERT) y HRT son los tratamientos de elección. Sin embargo, como hay nueva información sobre la fisiología de esteroides sexuales en las mujeres, y que sugieren considerablemente un papel importante de andrógenos (la Labrie et al., 2003, end Rev, 24(2): 152-182), el presente estudio compara los efectos hormonales generales de una alternativa a HRT o ERT, a saber DHEA, solo o en asociación con el Acolbifeno antiestrógeno puro

y también con Premarin en morfología vaginal de las ratas y en la expresión del receptor esteroide sexual. DHEA fue administrado percutáneamente para evitar primer paso al hígado (la Labrie et al., 1996, Endocrinol, 150: S107 -
5 S118).

Finalmente, nuestros resultados han mostrado un incremento significativo en peso vaginal con el tratamiento de Premarin, comparado con los animales OVX, el valor es similar al observado en el grupo tratado con DHEA. Es
10 apropiado recordar que, aunque el peso vaginal y uterino incrementa en los roedores y se utilice comunmente como medidas de estrogénicidad, estos órganos también pueden responder a la progesterona y testosterona, entre otros compuestos (Emmens and Martin, 1964, Dorfman Ed, Ed
15 Academic Press NY: 1).

En la combinación triple potencial, el estrógeno equino Premarin está destinado a actuar en el cerebro para aliviar los síntomas vasomotores. De hecho, los beneficios de la co-administración del Acolbifeno antiestrógeno
20 selectivo puro con un estrógeno para neutralizar los efectos periféricos no deseados del estrógeno, se han descrito en Labrie et al. (Labrie et al., 2003, Endocrinol, 144 (11): 4700-4706). En el presente estudio, cuando se dio Acolbifeno a animales OVX, la función

000110

morfológica más típica inducida por el SERM fue la
aparición de una capa superficial de pequeñas células
mucosas bien alineadas revistiendo una capa celular basal,
un patrón que era ligeramente más pronunciado en el grupo
5 Premarin + Acolbifeno y que se mantuvo preponderante en
todos los grupos tratados con Acolbifeno, incluyendo
cuando el SERM se agregó a DHEA. La mucificación del
epitelio vaginal bajo tratamiento con un antiestrógeno ha
sido reportada en ratas inmaduras (Anderson and Kang,
10 1975, Am J Anat., 144(2): 197-207) ratas adultas (Yoshida
et al., 1998, Cancer Lett, 134(1): 43-51). Aunque este
patrón morfológico ha sido comparado a la mucificación
inducida por progesterona (Anderson and Kang, 1975, Am J.
Anat, 144(2): 197-207), el mecanismo molecular por medio
15 del cual un antiestrógeno induce mucificación epitelial,
se mantiene desconocido.

Muchos efectos benéficos han sido reportados en
mujeres post-menopáusicas (Labrie et al., 1997, J. Clin.
Endocrinol. Metab., 82: 3498-3505; Labrie et al., 1991,
20 Mol Cell Endocrinol, .78: C113-C118). Como no se ha
caracterizado ningún receptor específico para DHEA, los
cambios morfológicos observados en la vagina de la rata
después del tratamiento de DHEA reflejan su conversión
intracrina en esteroides sexuales activos con acción
25 androgénica y/o estrogénica a través de mecanismos

intracrino (Labrie et al., 1991, Mol Cell Endocrinol, 78: C113-C118). Esos cambios comprenden una mucificación intensa epitelial, alta compactación de fibras de colágeno de *lamina propria* finamente tejidas y delicadas y un
5 incremento de espesor moderado en *muscularis* comparado con los animales OVX. Los dos primeros cambios morfológicos son típicos de efectos androgénicos mientras que el tercero muestra una actividad similar al estrógeno, es más allá soportado por un aumento concomitante en la expresión de
10 receptor de progesterona en la capa *muscularis*.

Como DHEA es transformado en cualquiera o ambos andrógenos y estrógenos en los tejidos periféricos, el epitelio grueso mucificado de capas múltiples después de tratamiento de animales OVX con DHEA, sugiere un efecto
15 androgénico predominante de mucificación en la vagina de la rata, un efecto que podría enmascarar cualquier efecto estrogénico menor coexistente potencial a nivel epitelial. Un estudio previo ha mostrado el mismo efecto de mucificación en la vagina de la rata (Sourla et al., 1998,
20 J Steroid Biochem. Mol. Biol., 66(3): 137 - 149); en ese estudio previo, la aplicación intravaginal de DHEA logró un efecto significativo a una dosis diez veces menor que la encontrada como activa después de la aplicación de DHEA en la piel dorsal.

Los presentes datos indican acciones coexistentes mayores androgénicas y menores estrogénicas coexistente de DHEA en la vagina de la rata. Además, los presentes resultados están soportados por la observación del
5 epitelio vaginal de animales OVX que recibieron la misma aplicación tópica de DHEA que la utilizada en este estudio, además de una dosis subcutánea del antiandrógeno Flutamida (FLU) (resultados inéditos). De hecho, el efecto androgénico de mucificación producida por el componente
10 androgénico de DHEA se invirtió completamente por FLU y resultó en un epitelio escamoso estratificado, típico de un efecto estrogénico (no se muestran los datos). Si DHEA tuviera un efecto androgénico exclusivo (mucificación) en la vagina de la rata este efecto se invertiría por FLU y
15 entonces se observaría un epitelio atrófico similar al de los animales OVX. Estudios previos en ratas macho y hembra gonadectomizadas han establecido claramente que el tratamiento con DHEA conduce a efectos androgénicos y/o estrogénicos estimuladores en próstata, vesícula seminal y
20 útero, mientras depende del tejido objetivo bajo investigación (Labrie et al., 1988, Endocrinol, 123: 1412-1417).

La combinación de DHEA + Acolbifeno, por otro lado, muestra una reducción en el grado de mucificación
25 epitelial, desplegando de esa forma la forma en que se

000121

alterna una capa celular mucosa bien alineada - un efecto de Acolbifeno - e invaginaciones de células mucosas hipertrofiadas de capas múltiples, que corresponden al efecto androgénico de DHEA. Por consiguiente, el

5 Acolbifeno inhibe el efecto estrogénico parcial de DHEA, mientras que la contraparte androgénica principal de DHEA se mantiene, y se agrega un pequeño efecto similar al estrógeno de Acolbifeno, éste último se aprecia mejor a nivel ostium. La disminución de peso vaginal observada

10 después de la adición de Acolbifeno a DHEA es menor que la obtenida después de la adición Acolbifeno a Premarin, ilustrando el mejor componente estrogénico de DHEA que se invierte por el antiestrógeno, mientras que el componente androgénico principal no es afectado. Además, los

15 incrementos en el espesor de *lamina propria* y en la compacidad de las fibras de colágeno, cuando se compara con aquellas de animales OVX y los animales intactos, en el grupo de DHEA + Acolbifeno, sugiere de nuevo, un papel potencial de andrógenos en la compacidad y espesor de

20 colágeno incrementado, ya que el componente estrogénico de DHEA es bloqueado por Acolbifeno.

Otros estudios han demostrado que la acción de DHEA en la glándula mamaria de la rata (Sourla et al., 1998, Endocrinol, 139: 753-764), glándulas sebáceas de la

25 piel (Sourla et al., 2000, J Endocrinol, 166(2): 455 -

462) y densidad mineral ósea (Martel et al., 1998, J Endocrinol, 157: 433-442) es casi exclusivamente androgénica. No obstante, la presencia de una acción estrogénica de DHEA en la vagina de la rata se ha
5 demostrado previamente a través de la inducción de la abertura vaginal y la ovulación precoz en ratas inmaduras tratadas con este compuesto, mientras que DHT, un andrógeno no el aromatizable a estrógenos, no produjo dichos efectos (Knudsen and Mahesh, 1975, Endocrinol,
10 97(2): 458-468). La capacidad del tejido vaginal de la rata para aromatizar los andrógenos, especialmente Testo, responde en su mayor parte mayor al efecto estrogénico de DHEA en este órgano (Lephart et al, 1989, Biol Reprod, 40(2): 259-267). Androst-5-ene-3 β , 17 β - diol (5-diol), un
15 metabolito de DHEA conocido porque se une al receptor estrógeno (Shao et al., 1950, Biol J - Chem, 250: 3095-3100; Poortman et al., 1975, J Clin Endocrinol Metab, 40(3): 373-379; Van Doorn et al., 1981, Endocrinol, 108: 1587 - 1594; Adams et al., 1981, Cancer Res, 41: 4720-
20 4726), también pudieron contribuir al efecto estrogénico (Poulin and Labrie, 1986, Cancer Res, 46: 4933-4937). La combinación propuesta del Acolbifeno antiestrógeno con DHEA prevendrían entonces cualquier efecto simulador no deseado de 5-diol. Por otro lado, el Acolbifeno mostraría
25 beneficios adicionales evitando pérdida de hueso (Martel

et al., 2000, J. Steroid Biochem Mol Biol, 74 (1-2): 45-56).

Según el mejor conocimiento adquirido, ningún estudio previo ha mostrado los efectos estimuladores de DHEA en la compacidad y morfología de las fibras de colágeno de *lamina propria* y a un menor grado, en el *muscularis*. Dichas acciones de andrógenos y estrógenos derivados de DHEA podrían tener efectos beneficiosos en la función vaginal en mujeres post-menopáusicas y deberían proveer los substratos requeridos para la acción de inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5, como sildenafil o tadalafil, posiblemente mediante facilitación mediada por (eNOS) de óxido sintasa mítica endotelial inducida por estrógeno de relajación del músculo liso vaginal (revisado en Munarriz et al., 2003, J Urol, 170 (2 Pt 2): S40-S44, Discusión S44-S45). De hecho, se ha encontrado que el Acolbifeno induce eNOS en células endoteliales humanas y en rata (Simoncini et al., 2002, Endocrinol, 143(6): 2052-2061).

Los resultados obtenidos en todos los grupos que involucraron el tratamiento con DHEA revelaron que la expresión de AR es sobre regulada por los andrógenos andrógenos derivados de la transformación intracrina de

DHEA en la vagina de la rata, de manera similar en los tres compartimientos del tejido.

Los cambios morfológicos benéficos, observados concomitantemente con la fuerte modulación de AR vaginal de rata por andrógenos, sugieren que niveles de suero reducidos de andrógenos derivados de DHEA mujeres postmenopáusicas podrían contribuir a la salud vaginal disminuida y eventualmente la pérdida de libido y gozo sexual observada en este grupo etario. El suero disminuido total Testo libre y DHEA-S se encontraron de hecho en mujeres que consultaron su deseo sexual disminuido (Guay and Jacobson, 2002, J Sex Marital Ther, 28 Suppl 1: 129-142).

En el presente estudio se ha demostrado que el tratamiento en ratas hembra OVX con DHEA o la combinación de DHEA con Acolbifeno, y de DHEA con Acolbifeno y Premarin invirtieron los cambios atróficos inducidos por OVX encontrados en la vagina a través de un efecto androgénico predominante, vía AR que se reflejó por la intensa mucificación epitelial y la compacidad aumentada de las fibras de colágeno en *lamina propria*. El tratamiento con DHEA solo también moderadamente aumentó el espesor de *muscularis*. Tales datos subrayan la importancia de esteroides sexuales sintetizados localmente de DHEA y

DHEA-S en tejidos objetivo periféricos. Además de estos efectos benéficos, Acolbifeno redujo la incidencia de inflamación, posiblemente a través de una inducción en forma de estrógeno de un epitelio escamoso keratinizado protector a nivel del ostium y un efecto antiestrogénico de mucificación a nivel interior.

Se han hecho varios intentos por resolver el problema de sequedad vaginal, a menudo vinculados con la dispareunia y la pérdida de goce sexual. Como un ejemplo, se prescriben a menudo las preparaciones del estrógeno vaginales locales para proporcionar alivio pero el endometrio puede estimularse por el estrógeno no opuesto (Mattson et al., 1989, Maturitas, 11: 217-222). En mujeres post-menopáusicas histerectomizadas, ERT todavía se usa pero con el riesgo incrementado muy conocido de desarrollar cáncer de mama. Es más, ERT disminuye los niveles de andrógeno de suero aumentando la hormona sexual que se une a globulina que puede inducir una deficiencia de andrógeno adrenal y ovárica creando así una razón adicional para el reemplazo de andrógeno fisiológico coexistente (Casson et al., 1997, Obstet Gynecol, 90(6): 995-998).

EJEMPLO 2

MÉTODOS

Animales y tratamiento

Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley de diez
5 a doce semanas de edad (Cr:CD(SD)Br) (Charles River
Laboratory, St-Constant, Canadá) pesando 215-265 g al
momento de su ovariectomía. Los animales se alojaron
individualmente en un cuarto controlado ambientalmente
(temperatura: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humedad: $50 \pm 20\%$; ciclos de 12-h
10 luz -12-h oscuro, encendiendo luces a las 07:15h). Se les
permitieron a los animales el acceso libre al agua del
grifo y un alimento para roedores certificado (Lab Diet
5002 (pellas), Ralston Purina, St-Louis, MO). El
experimento se condujo en instalaciones para animales
15 aprobadas por el Consejo Canadiense para el Cuidado de los
Animales (CCAC) y la Asociación para la Valoración y
Acreditamiento de Cuidado de Animal de Laboratorio
(AAALAC) de acuerdo con la Guía de CCAC para el Cuidado y
Uso de Animales Experimentales.

20 Se realizaron diferentes experimentos: dos
estudios de 20-días y dos estudios de 8 meses. En cada uno
de los dos primeros experimentos, los animales se
distribuyeron al azar entre 3 grupos de 13 o 14 animales

68

como sigue: 1) control Intacto; 2) control Ovariectomizados (OVX) ; 3) OVX + raloxifeno (0.5 mg/kg), 3) OVX + LY 363381 (0.5 mg/kg). En un estudio de 8 meses, los animales se distribuyeron al azar entre 5 grupos de 7-5 8 animales como sigue: 1) control Intacto; 2) control Ovariectomizados (OVX) ; 3) OVX + Acolbifeno (0.5 mg/kg); 4) OVX + ERA-923 (0.5 mg/kg); 5) OVX + TSE-424 (0.5 mg/kg). En el otro estudio de 8 meses, los animales se distribuyeron al azar entre 3 grupos de 10-11 animales 10 como sigue: 1) control Intacto; 2) Ovariectomizados (OVX) control; 3) OVX + el lasofoxifeno (0.5 mg/kg). En el primer día del estudio, los animales de los grupos apropiados eran bilateralmente ovariectomizados (OVX) bajo la anestesia de isoflurano. Los compuestos probados se 15 dieron entonces una vez diariamente por sonda oral como una suspensión en 0.4% metilcelulosa (0.5 ml /rata) de día 1 a día 20 del estudio o de día 1 a semana 32 del estudio.

Veinticuatro horas después de la última dosificación, los animales fueron sacrificados bajo 20 anestesia de isoflurano por desangramiento. Se recolectaron las vaginas y se sumergieron inmediatamente en 10% formalina regulada con pH neutro después de la resección. Las vaginas se cortaron entonces en 7 segmentos transversales (para Acolbifeno, ERA-923 y TSE-424) o se 25 cortaron para probar solamente el segmento transversal

medio, (raloxifeno, lasofoxifeno o LY 363381). Los
segmentos fueron procesados entonces rutinariamente y se
incrustaron en los bloques de parafina. Cuando fue
apropiado, todos los segmentos se posicionaron en el
5 bloque de parafina en una sucesión que corresponde a su
posición anatómica original y el perpendicularmente
orientado a la superficie del bloque, permitiendo así
cortar los segmentos en secciones transversales. Para cada
animal, se cortó una sección de parafina de 4µm de espesor
10 y se tiñieron con hematoxilín-eosina para el examen
morfológico.

En las figuras 10 y 11 se muestra una comparación
entre diferentes SERMs: morfología del epitelio vaginal,
en la rata OVX, a una amplificación 200X. Las fotografías
15 A a la D muestran la morfología epitelial del primer
segmento de la vagina (ostium). Aunque el epitelio de los
animales OVX es delgado (4-6 capas celulares), atrófico y
no muestra capa granular visible en A, el mismo epitelio
es más grueso en los 3 SERMs (8-11 capas celulares) y
20 muestra un compartimiento granular de capas múltiples, en
B, C y D. En E a K, se ilustra un segmento situado en medio
de la vagina. En los animales OVX, el epitelio vaginal es
delgado y atrófico (2-3 capas celulares), en E, mientras
el espesor se aumenta en todos los grupos tratados (F al
25 K), debido a la presencia de una (Acolbifeno, ERA-923 y

TSE-424) o muchas capas celulares mucosas (raloxifeno, lasofoxifeno o LY 363381) recubriendo la capa celular basal.

EJEMPLO 3

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley de diez a doce semanas de edad (Cr1:CD® (SD)Br VAF/Plus TM) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canadá) pesando aproximadamente 250-275g al inicio del experimento. Los animales se aclimataron a las condiciones ambientales (temperatura: $22 \pm 30^{\circ}\text{C}$; humedad: $50 \pm 20\%$; ciclos 12-h luz-12-h oscuridad, luces encendidas a las 07:15h) durante por lo menos una semana antes de empezar el experimento. Los animales fueron alojados individualmente y se les permitió el acceso libre para tomar agua y alimentos para roedores (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO). El experimento se condujo de acuerdo con la Guía CCAC para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales en una instalación de animales aprobada por el Consejo canadiense para el Cuidado de los Animales (CCAC) y la Asociación para la Valoración y Acreditamiento del Cuidado de los Animales de Laboratorio (AAALAC).

Se distribuyó al azar un total de 25 ratas hembra en 5 grupos como sigue: 1) Tres de control intacto ovariectomizadas (OVX); 2) Cuatro OVX + supositorio placebo; 3) Seis OVX + supositorio de DHEA 0.33 mg; 4) 5 Seis OVX + supositorio de DHEA 0.66 mg; 5) Seis OVX + supositorio de DHEA 1.00 mg. En el primer día del estudio, los animales de todos los grupos fueron bilateralmente ovariectomizados (OVX) bajo anestesia inducida por isoflurano. La inserción en la vagina de un supositorio 10 empezó en el día 5 del estudio y se continuó una vez diariamente hasta el día 18 del estudio, para un total de 14 días de tratamiento. El supositorio se puso suavemente en la abertura vaginal y entonces delicadamente se empujó aproximadamente 2-3 mm dentro de la vagina con la ayuda de 15 una pequeña varilla de vidrio, lisa, desinfectada en 70% de alcohol y se secó entre cada animal.

Veinticuatro horas después de la última dosificación, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de isoflurano por desangramiento. La vagina 20 incluso la uretra- y el útero se recolectaron, y entonces se cortaron como se describe a continuación. Para el análisis adicional, se sometieron a muestreo dos pedazos de glándula mamaria, así como un pedazo cuadrado de aproximadamente 2 X 2 centímetros de piel dorsal afeitada,

esta última puesta y delicadamente aplanada en un pedazo de cartón.

Preparación de los supositorios

Los supositorios de DHEA fueron preparados usando
5 base H-15 Whitepsol (Medisca, Montreal, Canadá). También
se puede utilizar cualquier otra base lipofílica como base
grasa, aceite vegetal hidrogenado, manteca de cocoa,
aceite de cacao *theobroma* u otras combinaciones de bases
de Whitepsol. Se pesaron las cantidades correctas de DHEA
10 para dar las concentraciones finales de 0.33 mg a 0.66 mg
o 1.00 mg por supositorio de un volumen final de 50 μ l $\pm$ 3
 μ l. La cantidad correcta de pellas base de supositorio a
pesar para obtener el volumen final requerido, estaba
calculada sobre la base de la densidad antes medida de la
15 base de supositorio, que era 47.5 mg por 50 μ l. La base de
supositorio se puso en un vaso de precipitados pequeño,
derretido en microondas a una potencia de 50%
aproximadamente durante 3 minutos y 30 segundos y luego
transferir sobre una placa de calefacción, que fue
20 ajustada a la menor potencia para mantener la base de
supositorio a una temperatura de 50 ± 3 °C. Se agregó
polvo micronizado DHEA (obtenido de Scheweizerhall Inc. a
una pureza de 100%) en la base, todo a la vez, todo la
agrupación se dejó hundir y humectarse durante 3 minutos

antes de ser meticulosa y lentamente aplanado y disuelto con una varilla de vidrio de final lisa de punta redondeada. Finalmente, se virtió la base con DHEA disuelto (el placebo fue la base sin DHEA), usando una
5 pipeta de 1000 μ -Gilson con una punta de pipeta precalentada, en rejillas de tubos que contienen una serie de moldes de 50 μ l. Estos moldes fueron hechos de tubos de microcentrífuga, cada uno de ellos previamente calibrado con 50 μ l de agua y cortados al nivel de la línea demarcada
10 en la superficie de agua. Después de 30 minutos de enfriamiento a temperatura ambiente, los supositorios se puesieron a 4°C durante otros 30 minutos. Finalmente, el exceso de base fue cortado con una hoja de afeitar y los supositorios fueron retirados de sus moldes y almacenados
15 en botellas de vidrio cerradas a 4 °C hasta el uso. Se permitió que llegaran a temperatura ambiente antes de ser aplicados a los animales.

Procedimientos histológicos

Los órganos fueron sumergidos en formalina
20 regulado con pH neutro al 10% inmediatamente después de resección. Cada vagina y útero fueron divididos en 8 segmentos transversales iguales y 4 segmentos transversales incluyendo dos del cérvix y dos de cada uno, de las dos trompas proximales y distales, respectivamente.

Los segmentos fueron entonces procesados rutinariamente e integrados todos juntos en el mismo bloque de parafina. Dentro del bloque de parafina, todos los segmentos fueron colocados en una secuencia correspondiente a su posición
5 anatómica original y orientados perpendicular a la superficie del bloque, permitiendo por lo tanto que los segmentos sean cortados en secciones transversales. Para cada animal, se cortó una sección de parafina de espesor de 4µm y se tiñó con hematoxilín-eosina para el examen
10 morfológico.

Resultados

Morfología del epitelio

Después del examen de todos los segmentos vaginales, se descubrió que los segmentos 4 y 6 son
15 representativos para compararse entre los tratamientos. El segmento 4 era el más proximal al ostium que no muestre las funciones de la piel externa, y no fue afectado o en menor grado fue afectado por los cambios inflamatorios de ligeros a moderados, encontrados generalmente en el area
20 externa de la mucosa vaginal en los animales de control. El segmento 6 representó la mucosa vaginal más profunda y está separado del cerviz (cuello del útero) solamente por un segmento. En general, el lado ventral de la vagina

muestra un epitelio más grueso y más mucificado cuando se compara con el costado dorsal.

Intacto

Como se muestra en la figura 13, en estrus, que
5 está bajo influencia estrogénico muy importante, el
epitelio vaginal es grueso y keratinizado. Despliega de 12
a 18 capas celulares en 4 segmentos, y de 12 a 15 capas en
el segmento. Contrario al epitelio escamoso estratificado
grueso visto en el ostium, las capas granulares no son
10 obvias en el epitelio vaginal interno. En metestrus, bajo
influencia hormonal mínima, el epitelio vaginal es más
delgado. Muestra de 6 a 10 capas celulares en segmento 4 y
5 a 7 capas en segmento 6.

Ovariectomizados sin contacto

15 Como se muestra en la figura 14, en el segmento
4, la vagina es cubierta por un epitelio estratificado
escamoso de 2 a 6 capas celulares. El espesor de este
segmento es muy variable entre los animales. En el
segmento 6 se observa atrofia completa, con 2 a 3 capas
20 celulares de células planas. Se pueden ver algunos focos
infrecuentes de células mucosas cilíndricas pequeñas a lo
largo de toda la vagina de estos animales. De los tres

animales de este grupo, dos demostraron cambios inflamatorios ligeros en los tres segmentos externos.

Placebo

Como se muestra en la figura 15, en la
5 comparación con el grupo sin tocar OVX, el epitelio
estratificado escamoso vaginal del grupo placebo fue
ligeramente más grueso, con el segmento 4 que muestra de 4
a 8 capas celulares. Sin embargo, en el segmento 6, se
observó la misma morfología descubierta en el grupo sin
10 tocar OVX, con 2 - 3 capas celulares epiteliales. Como en
los animales sin tocar OVX, se pueden encontrar focos de
células mucosas cilíndricas pequeñas en toda la vagina,
ligeramente más cuando se comparan con los animales sin
tocar OVX. De los cuatro animales de este grupo, tres
15 demostraron cambios inflamatorios leves en los tres
segmentos externos.

Supositorio de 0.33 mg. de DHEA

Como se muestra en la figura 16, en general, a
dosis bajas, el efecto morfológico de DHEA se caracteriza
20 por células mucosas cilíndricas bien alienadas mientras
que a dosis más altas, las células mucosas se alargan
(hipertrofia), se vacuolan y se apilan. En el presente
grupo, el efecto de DHEA es ligeramente discernible en el

segmento 2 y aumenta gradualmente en los segmentos 3 - 4, donde hay una alternancia de células mucosas bien alineadas y con hipertrofia. El efecto de DHEA reduce lentamente en los segmentos 5 y 6 donde se puede observar casi solamente células mucosas bien alineadas. El efecto se reduce en el segmento 7 y desaparece en los pliegues vaginales laterales del segmento 8 (que incluye el principio del cuello del útero). Por lo tanto, en el segmento 4, el epitelio vaginal es escamoso estratificado con 3 a 7 capas celulares. Aproximadamente 20 a 60 % del revestimiento vaginal consta de células mucosas bien alineadas en alternancia con 15 a 50 % células mucosas con hipertrofia, que recubren uno o más capas de epitelio estratificado escamoso, y áreas sin mucificar. En el segmento 6, el espesor epitelial se reduce a casi el espesor encontrado en animales sin tocar OVX. Consiste en un epitelio estratificado escamoso de 2 a 5 capas celulares, cubierto por una capa de células mucosas bien alineadas. Se observó una gran diferencia en la ocurrencia de células mucosas, estas células cubren del 5 al 75 % de la superficie vaginal, en alternancia con áreas sin mucificar. De los seis animales tratados, cuatro de ellos demostraron inflamación leve, distribuida desigualmente sobre la vagina completa.

Supositorio de 0.66 mg. de DHEA

Como se muestra en la figura 17, en este grupo, el efecto de DHEA es discernible en el segmento 2 y aumenta significativamente en los segmentos 3 - 4 y 5 donde se observa una mayoría de células mucosas con hipertrofia. El número de células mucosas con hipertrofia disminuye en los segmentos 6 y 7 donde la mayoría de las células son células mucosas bien alineadas. Por lo tanto, en el segmento 4, el epitelio estratificado escamoso se extiende desde la capa celular 3 a 6. Aproximadamente del 5 al 20 % del recubrimiento vaginal consiste de células mucosas bien alineadas en alternancia con un 10 a 75 % de células mucosas con hipertrofia, recubriendo una o más capas del epitelio escamoso estratificado. Tampoco está presente ningún área epitelial sin mucificar. En el segmento 6, se reduce el espesor epitelial y consiste de un epitelio estratificado escamoso de 2 a 4 capas celulares, superado por una capa de células mucosas bien alineadas. La cantidad de áreas mucificadas varía de 20 a 80 % de la superficie vaginal, en alternancia con áreas no mucificadas. De los seis animales tratados, dos demostraron inflamación leve en los tres segmentos externos.

Supositorio de 1.00 mg. de DHEA

Como se muestra en la figura 18, en este grupo, el efecto de DHEA es también discernible en el segmento 2, pero incrementa significativamente en los segmentos 3 - 4 y 5 donde se observa vasta mayoría de células mucosas con hipertrofia, y se reduce muy lentamente en los segmentos 6 - 7 y 8, donde se observa vasta mayoría de células mucosas bien alineadas. Por lo tanto, en el segmento 4, el epitelio estratificado escamoso demuestra 3 a 9 capas celulares. Células mucosas con hipertrofia recubren 3 a 4 capas celulares de escamoso cubren del 50 al 70 % de la superficie vaginal mientras que las células mucosas bien alineadas cubren del 5 al 30 % de la superficie vaginal. No está intercalada ningún área mucificada entre las células mucificadas. En el segmento 6, el espesor epitelial también se reduce y consiste de 2 a 4 capas celulares. Células mucosas con hipertrofia que recubren de 1 a 3 capas celulares escamosas cubren aproximadamente del 30 al 100 % de la superficie vaginal de mientras las células mucosas bien alineadas cubren del 0 al 70 %. También se observan pocas áreas mucificadas intercaladas. De los seis animales tratados, cuatro de ellos demostraron inflamación leve en los cuatro segmentos externos.

Conclusiones

1.- El vehículo utilizado para el tratamiento intravaginal de ratas tiene características deseables:

a) Se prepara fácilmente en molde calibrado;

5 b) Capacidad excelente de disolver totalmente el polvo DHEA micronizado, garantizando por lo tanto, una dosis estandarizada;

 c) Sin reacción y alteraciones morfológicas de tejido importante de la mucosa vaginal: solamente se
10 observó un aumento leve del espesor del epitelio que en los primeros 3 a 4 segmentos, posiblemente debido a las manipulaciones que acompañan la inserción del supositorio.

2.- La DHEA produjo un efecto sobre la morfología epitelial vaginal a la dosis evaluada más baja
15 (supositorio de 0.33 mg.). El efecto es máximo del 3er al 5to segmento, luego disminuye gradualmente para desaparecer a nivel del 7mo segmento.

3.- A una dosis supositorio de 0.66 mg. de DHEA, el efecto también está presente en el 3er segmento y
20 permanece muy fuerte en el 6to segmento.

4.- A una dosis supositorio de 1.00 mg. de DHEA, el efecto es fuerte desde los segmentos 2 - 3 hasta los

pliegues vaginales profundos que están cerca del cuello del útero uterino.

Ejemplos de la composición farmacéutica

Se establece a continuación, a modo de ejemplo y no de limitación, algunas composiciones farmacéuticas que utilizan Acolbifeno SERM activo preferido, precursor de esteroide sexual activo DHEA preferido, estrógeno 17 β -estradiol o premarin preferido, inhibidor fosfodiesterasa GMPC tipo 5 Tadalafil o Sildenafil preferido. La concentración de ingrediente activo puede variar en un amplio rango como se discutió en la presente invención. Las cantidades y tipos de otros ingredientes que se pueden incluir se conocen bien en la técnica.

EJEMPLO A

15

Tableta

20

Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
DHEA	15.0
Gelatina	5.0
Lactosa	63.5
Almidón	16.5

82

EJEMPLO B

Cápsula de gelatina

5	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	DHEA	15.0
	Lactosa hidratada	70.0
	Almidón	4.8
	Celulosa microcristalina	9.8
10	Estearato de magnesio	0.4

EJEMPLO C

Tableta

15	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Gelatina	5.0
20	Lactosa	58.5
	Almidón	16.5

25

EJEMPLO D

Cápsula de gelatina

5	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Lactosa hidratada	65.0
	Almidón	4.8
10	Celulosa microcristalina	9.8
	Estearato de magnesio	0.4

15

EJEMPLO E

Tableta

20	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Premarin	0.5
	Gelatina	5.0
	Lactosa	63.0
25	Almidón	16.5

EJEMPLO F

Cápsula de gelatina

5	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Premarin	0.5
	Lactosa hidratada	64.5
10	Almidón	4.8
	Celulosa microcristalina	9.8
	Estearato de magnesio	0.4

EJEMPLO G

15

Tableta

	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Sildenafil	15.0
20	DHEA	15.0
	Gelatina	5.0
	Lactosa	48.5
	Almidón	16.5

25

85

EJEMPLO H

Cápsula de gelatina

5	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Sildenafil	15.0
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Lactosa hidratada	50.0
10	Almidón	4.8
	Celulosa microcristalina	9.8
	Estearato de magnesio	0.4

15

EJEMPLO I

Tableta

20	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Sildenafil	15.0
	Gelatina	5.0
	Lactosa	43.5
25	Almidón	16.5

EJEMPLO JCápsula de gelatina

	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
5	Acolbifeno	5.0
	DHEA	15.0
	Sildemafil	15.0
	Lactosa hidratada	50.0
	Almidón	4.8
10	Celulosa micricristalina	9.8
	Estearato de magnesio	0.4

EJEMPLO KCrema vaginal

15	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	DHEA	1.0
	Acolbifeno	0.2
	Cera emulsificante, NF	18.0
20	Aceite mineral ligero, NF	12.0
	Alcohol bencílico	1.0
	Etanol 95% USP	33.8
	Agua purificada, USP	34.0

EJEMPLO LSupositorio vaginal

5	Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
	DHEA	0.66 a 2.0
	Base Whitepsol H-15	98 a 99.34

Se prepararán supositorios de DHEA utilizando base Whitepsol H-15 (Medisca, Montreal, Canadá). Se puede
10 utilizar cualquier otra base de lipofílica como Fattibase, Wecobee, manteca de cacao, aceite de theobroma u otras combinaciones de bases Whitepsol.

Ejemplos de kit

Se establece a continuación, a modo de ejemplo y
15 no de limitación, algunos kits que utilizan Acolbifeno SERM activo preferido, precursor de esteroide sexual activo DHEA preferido, estrógenos conjugados o estrógeno 17 β -estradiol preferidos, inhibidor fosfodiesterasa GMPc tipo 5 Tadalafil o Sildenafil preferido. La concentración
20 de ingrediente activo puede variar en un amplio rango como se discutió en la presente invención. Las cantidades y tipos de otros ingredientes que se pueden incluir se conocen bien en la técnica.

88

EJEMPLO A

El SERM, los estrógenos y el inhibidor fosfodiesterasa GMPc tipo 5 se administran de forma oral mientras el precursor esteroide sexual se aplica a nivel 5 administrado de manera local o percutáneamente.

Composición de SERM para administración oral (cápsulas)

10

ngrediente	% Peso (en peso de la composición total)
Acolbifeno	5.0
Lactosa hidratada	80.0
Almidón	4.8
Celulosa microcristalina	9.8
Estearato de magnesio	0.4

SERM + composición de estrógenos para administración oral (cápsulas)

15

Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
Acolbifeno	5.0
Premsrin	0.5
Lactosa hidratada	79.5
Almidón	4.8
Celulosa microcristalina	9.8
Estearato de magnesio	0.4

SERM + estrógenos + composición de inhibidor de GMPC

fosfodiesterasa de tipo 5

para administración oral (cápsulas)

5

Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
Acolbifeno	5.0
Premarin	0.5
Sildenafil	15.0
Lactosa hidratada	64.5
Almidón	4.8
Celulosa microcristalina	9.8
Estearato de magnesio	0.4

10

Composición precursor esteroide sexual para

administración tópica (gel)

15

Ingrediente	% Peso (en peso de la composición total)
DHEA	2.0
Triglicérido-cáprico- caprílico (Neobee M-5)	5.0
Hexileno-glicol	15.0
Transcutol (eter monometil de dietilenglicol)	5.0

Alcohol bencílico	2.0
Ciclometicona (Dow Corning 345)	5.0
Etanol (absoluto)	64.0
Hidroxipropilcelulosa (1500 cps) (KLUCEL)	2.0

5

EJEMPLO B

El SERM, los estrógenos y el precursor esteroide sexual se administran de forma oral

Composición de precursor de esteroide sexual para
administración oral (cápsula de gelatina)

	% Peso (en peso de la composición total)
DHEA	15.0
Lactosa hidratada	70.0
Almidón	4.8
Celulosa microcristalina	9.8
Estearato de magnesio	0.4

10

15

En las formulaciones anteriores se pueden
sustituir otros SERMs (Toremifeno, Ospemifeno, Raloxifeno,
Arzoxifeno, Lasofoxifeno, TSE-424, ERA-923, EM-800, SERM-
3339, GW-5638) por Acolbifeno, así como otros inhibidores
5 esteroide se pueden sustituir por DHEA, otros estrógenos
se pueden ser sustituir por Premarin y otro inhibidor
fosfodiesterasa GMPc tipo 5 se puede sustituir por
Sildenafil o Tadalafil o por Prostaglandin E1. Se pueden
incluir más de un SERM o más de un precursor o estrógenos
10 o inhibidor fosfodiesterasa GMPc tipo 5 y en tal caso el
porcentaje de peso combinado es preferente que el
porcentaje de peso para el precursor solo o el SERM solo
dado en los ejemplos anteriores.

La invención ha sido descrita en los términos de
15 las modalidades y ejemplos preferidos, pero no se limita
por la misma. Aquellos expertos en la técnica reconocerán
fácilmente la aplicabilidad más amplia y el alcance de la
invención que se limita solamente por las reivindicaciones
de patentes.

P-928
Rvs modificadas solicitud DIVISIONAL
Mayo 31, 2012

REIVINDICACIONES

5 ~~4~~1. Una composición farmacéutica para aplicación vaginal
que comprende:

(a) un excipiente, diluyente o vehículo
farmacéuticamente aceptable;

(b) una cantidad terapéuticamente efectiva de al
menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo
10 que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de
dehidroepiandrosterona, y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol; y

(c) una cantidad terapéuticamente efectiva de al
menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para
la protección de la glándula uterina y mamaria contra el
15 cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de
estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de
Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno,
OH-Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno,
Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923,
20 Lasofoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-
1538), EM-65 y EM-800 ~~RA~~.

2. La composición farmacéutica de acuerdo con la
reivindicación 1 en donde el portador, diluyente ó excipiente
25 es un gel.

3. La composición farmacéutica de acuerdo con la
reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es un
supositorio o un óvulo.

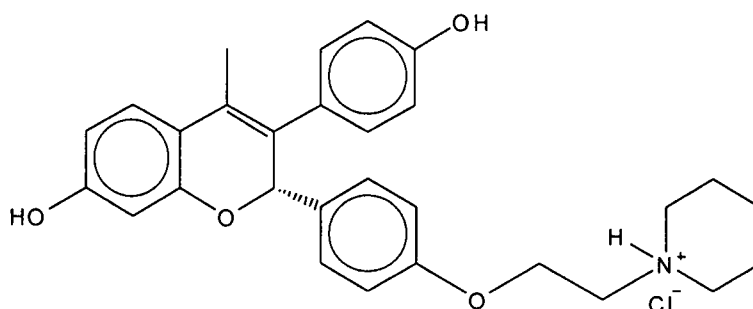
30

P-928

Rvs modificadas solicitud DIVISIONAL

Mayo 31, 2012

4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho modulador receptor de estrógeno selectivo es:



5

5. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 4 en donde el precursor esteroide sexual es dehidroepiandrosterona.

10

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el precursor esteroide sexual comprende hasta 2% en peso con relación al peso total de la composición.

15

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la cantidad del precursor esteroide sexual es 0.66 a 2.0% en peso.

20

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 en donde el excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable es lipofílico.

25

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, 7 ó 8 en donde el excipiente, diluyente ó vehículo se selecciona del grupo que consiste de bases Witepsol (que incluye Witepsol H-15), fattibase, Wecobee,

P-928

Rvs modificadas solicitud DIVISIONAL

Mayo 31, 2012

manteca de cacao, aceite de theobroma, y combinaciones de las mismas.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el excipiente, diluyente ó vehículo es Witepsol H-15.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el excipiente, diluyente ó vehículo es Witepsol H-15 y el precursor esteroide sexual es dehidroepiandrosterona.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en la forma de un supositorio u óvulo en donde el excipiente, diluyente ó vehículo es Witepsol H-15 y el precursor esteroide sexual es dehidroepiandrosterona.

13. Una composición farmacéutica para aplicación percutánea que comprende:

(a) un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

(b) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol; y

(c) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH-Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923,

000154

P-928

Rvs modificadas solicitud DIVISIONAL

Mayo 31, 2012

Lasofoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.

- 5 ~~X~~ 14. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende:
- (a) un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable;
- (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de al
- 10 menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol; y
- (c) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para
- 15 la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH-Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno,
- 20 Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923, Lasofoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.

15 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es acolbifeno.

30 16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en donde el precursor esteroide sexual es dehidroepiandrosterona.

35 17. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27 en donde el precursor esteroide sexual es dehidroepiandrosterona y el modulador selectivo del receptor de estrógeno es acolbifeno.

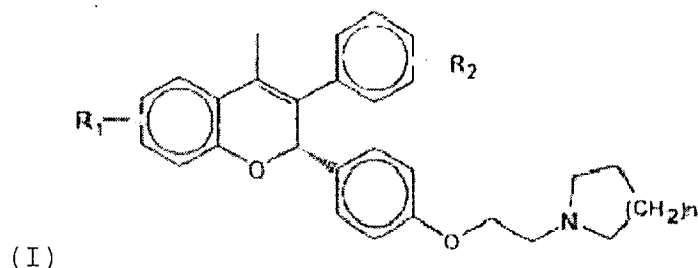
000155

P-928
Rvs modificadas solicitud DIVISIONAL
Mayo 31, 2012

5

RESUMEN DE LA INVENCION

Métodos novedosos para tratar o reducir la probabilidad de adquirir disfunciones vaginales, más particularmente resequedad vaginal y dispareunia, que conducen a la disfunción sexual y a un bajo deseo y rendimiento sexual, en animales susceptibles, de sangre caliente incluyendo humanos, que involucra la administración de un precursor esteroide sexual. La administración adicional de estrógeno o modulador receptor de estrógeno selectivo, particularmente aquéllos seleccionados del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno, Tamoxifén, Droloxifeno, Toremifeno, Yodoxifeno, GW 5638, TSE-424, ERA-923, y lasofoxifeno, y muy particularmente compuestos que tienen la estructura general:



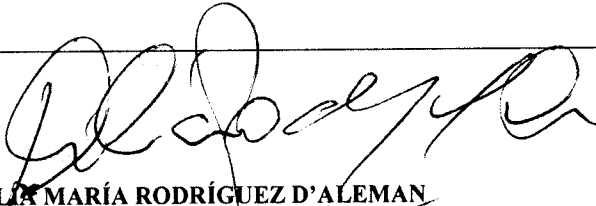
se describe específicamente para el tratamiento médico y o inhibición de desarrollo de algunas de estas enfermedades anteriormente mencionadas. También se describen composiciones farmacéuticas para el suministro de ingrediente(s) activo(s) y kit(s) útiles para la invención.

97

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación 07-050.824A
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/CA2005/001612	Fecha 20 de Octubre de 2005
Publicación Internacional No.		WO 2006/042409 A1	Fecha 27 de Abril de 2006
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN AL MENOS UN PRECURSOR SEXUAL EN COMBINACIÓN CON AL MENOS UN MODULADOR RECEPTOR DE ESTRÓGENO SELECTIVO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 31/5685		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
ENDORECHERCHE, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 2989 de la Promenade, Sainte-Foy, Quebec G1W 215		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Quebec		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Canadá		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Canadá	
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. EL-ALFY,		Mohamed	Canadiense
2. LABRIE,		Fernand	Canadiense
3. BERGER,		Louise	Canadiense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Canadá		Quebec,	3414 Maricourt, Apt. 1, Sainte-Foy, Quebec G1W 2M5
2. Canadá		Quebec,	2989 de la Promenade, Sainte-Foy, Quebec G1W 215
3. Canadá		Quebec,	3385 Maricourt #19, Sainte-Foy, Quebec G1W 2M2
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN	Cra. 11 No. 86 - 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088
CIUDAD	Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co
PAÍS	Colombia		
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. Estados Unidos de América		US	60/620,452
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2004/10/20
			000'5"

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 12-0060845	Fecha 19/06/2012
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 88		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 17		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

PERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0060845

Bogotá D.C., Junio 19 de 2012 - 16:50:20

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	432304364	19/06/2012	56.610.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-050824-A-00000-0000

Fecha: 2012-08-23 09:56:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 314

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-050824- -00013-0000

Fecha: 2012-07-05 15:26:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 159

000'58

P 3409

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 19 de 2012 - 16:50:29

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0067129

Bogotá D.C., Julio 04 de 2012 - 14:59:59

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	28277	21/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	28278	21/03/2012		370.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46148	09/05/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46170	09/05/2012		120.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46171	09/05/2012		120.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46172	09/05/2012		120.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46173	09/05/2012		120.000.00
RECIBO DE CA	999999999	48856	17/05/2012		370.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

7 50005-D1-01 SOLICITUDES

CONCEPTO

1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
A LAS 10 INICIALES

Vr.UNDITARIO

30.000.00

Vr.CONCEPTO

210.000.00

\$210.000.00

SON: **DOSCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-050824-A-00000-0000

Fecha: 2012-08-23 09:56:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 314

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-050824-00013-6600

Fecha: 2012-07-05 15:26:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 159

000150

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 4 de 2012 - 15:00:22